

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Direktor: Prof. Dr. Ch. Rube
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die Reparatur von strahleninduzierten DNA-
Doppelstrangbrüchen in den Enterozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2012

vorgelegt von: Efstathios Papadopoulos
geb. am: 08.07.1982 in Kalamata

Für meine Familie

Abkürzungen

53p	53 binding protein
A-T	Ataxia-telangiectasia
ATLD	Ataxia telangiectasia-like disorder
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATR	Ataxia-telangiectasia mutated-Rad3-Related
BRCA1	Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility gene
CT	Computer Tomography
DNA-PK	DNA-dependent Proteinkinase
DSB DNA	Double strang breaks
h	hours
HR	homologous Recombination
LIG	Ligase
min	minutes
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 Komplex
NHEJ	Non homologous Endjoining
PBS	phosphate-buffered saline
PFGE	Puls-Feld Gel Elektrophorese
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase related kinase
PNKP	Polynucleotid kinase/phosphatase
SCID	severe combined immunodeficiency
TDP1	tyrosyl-DNA Phosphodiesterase
V(D)J	variable diversity joining
WRN	Werner Syndrome Protein
XRCC	X-Ray Repair Cross Complementing

INHALT	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	4
 2. EINLEITUNG	
2.1 Strahlentherapie und der Einfluss auf die verschiedenen Organe	8
2.2 Aufbau des Darmes	
2.2.1 Allgemeiner makroskopischer Aufbau und Funktion des Darmes	8
2.2.2 Die Histologie des Dünndarms	9
2.2.3 Die Histologie des Epitheliums mucosae	11
2.3 DNA-Doppelstrangbrüche	13
2.4 Reparaturmechanismen von DNA-DSBs	13
2.4.1 Die Zellreaktion auf die DNA-Schädigung	16
2.4.2 Homologe Rekombination (HR)	17
2.4.3 Nicht homologes Endjoining (NHEJ)	20
2.4.4 HR und NHEJ Interaktionen	22
2.4.5 ATM Proteinkinase	22
2.4.6 γ H2AX	23
2.5. DSB Reparaturprofiziente und –defiziente Mausstämmen	24
 3. MATERIAL UND METHODIK	
3.1 Verwendete Mausstämmen	26
3.2 Bestrahlungsplan	26
3.3 Organentnahme und Herstellung der Gewebeschnitte	29
3.4 γ -H2AX Immunfluoreszenz-Färbung	29
3.5 Quantifizierung von γ -H2AX Foci	30
3.6 Statistik	30
 4. ERGEBNISSE	
4.1 DSB Induktion im Dünndarmgewebe	32
4.2 DSB Reparatur in verschiedenen Mausstämmen	34

5. DISSKUSION

5.1 Die Interpretation der Foci in den Untersuchungen	40
5.2 Analyse von γ H2AX als prädiktiver Test für die Radiosensitivität	41
5.3 Vergleich der DSB-Reparatur in Organen mit unterschiedlicher Radiosensitivität	42
5.4 Die Bedeutung der DSB Analyse mittels γ -H2AX Immunfluoreszenz	43

6. LITERATURVERZEICHNIS	44
--------------------------------------	-----------

7. Dank	60
----------------------	-----------

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Ziele

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) gehören zu den schwersten Formen der DNA Schädigung nach ionisierender Strahlung. Zellen von Säugern mit Defekten in den für die DSB Reparatur notwendigen Proteinen, weisen oft eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf. Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen hängt aber nicht nur von der DSB-Reparatur ab, sondern auch vom Differenzierungsgrad in dem sich die Zellen befinden. Ausdifferenzierte Zellen sind in der Regel strahlenresistenter als proliferierende Zellen. Der Einfluss des Differenzierungsgrades auf die Strahlenempfindlichkeit, spiegelt sich in den unterschiedlichen Geweben und Organen eines Organismus wieder. Gerade in der Strahlentherapie spielt die Strahlenempfindlichkeit der unterschiedlichen Organe eine wichtige Rolle, da nicht nur ein mögliches Tumorareal mit einer hohen Strahlendosis versorgt werden soll, sondern gesundes Gewebe geschont werden muss. Das Ziel der Studie ist die DSB-Reparatur in Dünndarmzellen und ihren Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit quantitativ zu erfassen. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung von γ -H2AX, ist man in der Lage einzelne DSBs nachzuweisen und damit die Induktion und Reparatur von strahleninduzierten DSBs quantitativ zu messen. In dieser Studie werden Dünndarmzellen von reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Mäusen mit Hilfe von γ -H2AX Immunfluoreszenz untersucht.

1.2 Material und Methode

Für die DSB-Induktion wurde Dünndarmgewebe von reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Mäusen nach 10 min auf DSBs untersucht. Dafür wurden die Mäuse mit einer Ganzkörperbestrahlung von 0.1 Gy, 0.5 Gy und 1.0 Gy behandelt. Für die DSB-Reparatur wurde ebenfalls Gewebe von reparaturprofizienten und von reparaturdefizienten Mäusen verwendet. Die Mäuse wurden einer Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy unterzogen und nach 0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h und 48 h auf die DSB-Reparatur hin analysiert. In jeder Untersuchung wurden Mäuse mit einer Scheinbestrahlung behandelt, die als Kontrolle dienten. Für die Untersuchung wurde die γ -H2AX Immunfluoreszenz zur DSBs-Färbung (Foci) verwendet.

1.3 Ergebnisse

Bei der DSB-Induktion wurde eine lineare Zunahme der DSBs mit der Bestrahlungsdosis beobachtet. Die Reparaturkinetik zeigte wie effizient die Beseitigung der DSBs in den verschiedenen Mausstämmen abläuft. Die C57BL/6 Mäuse reparierten die induzierten DSBs am schnellsten und sie zeigten einen geringen Residualschaden nach 24h und 48h. Im Gegensatz dazu war die DSB-Reparatur bei SCID (sever combined immunodeficiency) Mäuse generell stark eingeschränkt, so dass zu allen Zeitpunkten der Reparaturkinetik eine hohe Anzahl von Foci zu sehen war. Die A-T (Ataxia teleangiectasia) Mäuse zeigten einen Reparaturdefekt, der hauptsächlich zu späteren Zeitpunkten (≥ 5 h) signifikant war. Bei dem Balb/c Mausstamm wurde generell eine leicht erhöhte Foci-Anzahl im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen beobachtet die aber nach 48 h nicht mehr zu sehen war.

1.4 Schlussfolgerung

Generell eignet sich die γ -H2AX Foci Quantifizierung zur Messung von DSBs in unterschiedlichen Geweben nach in vivo Bestrahlungen mit klinisch relevanten Bestrahlungsdosen. Die Tatsache, dass selbst kleine Unterschiede in der DSB Reparatur, verursacht durch Polymorphismen, nachgewiesen werden können, erlaubt es, die γ -H2AX Foci-Analyse als prädiktiven Test für die Strahlenempfindlichkeit zu verwenden. Weiterhin sind die vergleichbaren Reparaturkinetiken der verschiedenen Organe ein Hinweis darauf, dass die Strahlenempfindlichkeit der Organe nicht von zellspezifischen Unterschieden im Reparaturverhalten abhängt, sondern eher bestimmt wird durch den Differenzierungsstatus und die Proliferationsrate.

ABSTRACT

Purpose

DNA Double-Strand Breaks (DSBs) are one of the most severe forms of DNA damage after irradiation. Mammalian cells with Gene deficiencies in the DSB repair proteins show an increased sensitivity against ionising Radiation. The sensitivity of the cells it depends not only from the DSB repair but also from the grade of the cell-differentiation. Thus differentiated cells are more resistant against irradiation than highly proliferating cells. These differences play a very important role in the toxicities of the organs due to ionising radiation. This is very important in radiotherapy, because a tumor area must be treated with the maximal Dose, without damaging the neighboring normal tissues. The purpose of this study is to investigate the DSB repair mechanisms in small intestine cells and their influence on the radiation sensitivity of the organ. With γ -H2AX Immunofluorescence we can investigate the DSBs in form of γ -H2AX foci and thus we can measure the induction and DSBs repair. For this purpose, small intestine cells repair proficient and repair deficient mice were stained and analysed under microscope.

Materials and methods

For the induction of the DSBs small intestine of repair proficient and repair deficient mice was collected and analysed 10 min after whole body irradiation with 0.1 Gy, 0.5 Gy and 1.0 Gy. For the DSB repair kinetics, small intestine treated with a whole body irradiation with 2 Gy and the tissue was collected and analysed after 0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h, and 48 h of DNA repair. Small intestine of sham-irradiated mice of each strain served as controls. For the detection of the DSB γ -H2AX Immunofluorescence was used.

Results

The DSB induction demonstrated similar γ -H2AX foci levels with a linear dose correlation. The DSB repair analysis demonstrated the differences between the repair proficient and repair deficient mice strains. So in the C57BL/6 mice experiments the γ -H2AX foci elimination was faster and more efficient, than in the Balb/c, A-T, or SCID mice experiments.

Conclusion

γ -H2AX foci analysis demonstrated that even small deficiencies or polymorphisms in the DNA repair system can be accurately detected and measured. Thus this could be used as a screening test to detect deficiencies in the DNA repair system. The similarities of the DSBs repair in different organs suggest that tissue-specific differences in radiation responses are independent of DSB rejoining and they depend more on differentiation and proliferation rate of their cells

2. EINLEITUNG

2.1 Strahlentherapie und der Einfluss auf die verschiedenen Organe

Die Strahlentherapie stellt eine sehr wichtige Komponente bei der kurativen und palliativen Behandlung von malignen und benignen Tumoren dar, sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit chirurgischen und chemotherapeutischen Verfahren. Leider ist eine gewisse Belastung der gesunden Zellen, die in direkter Umgebung von Tumorzellen sind, nicht zu vermeiden. Eine solche Wirkung von ionisierender Strahlung kann akute und späte Folgen haben. Häufig beobachtet man, eine akute Schädigung (akute Toxizität) durch ionisierende Strahlung im Gewebe, welches eine hohe Proliferationsrate besitzt. Die ionisierende Strahlung schädigt in solchem Gewebe vorwiegend die proliferierenden Vorläuferzellen, die für die Proliferation, Regeneration und Differenzierung zuständig sind. Es ergibt sich eine Reduktion von funktionstüchtigen Vorläuferzellen, die aber durch die Proliferation von Stammzellen die überlebt haben, kompensiert werden kann. Im Gegensatz zur akuten Schädigung durch ionisierende Strahlung, sind die Spätfolgen (späte Toxizität) eher bei Gewebe zu beobachten, das eine niedrige Proliferation und hochdifferenzierte Zellpopulationen mit spezialisierten Funktionen aufweisen. Die Folgen von solchen Schäden sind oft progredient und sprechen schlecht auf therapeutische Behandlungen an. Der Dünndarm gehört zu den Organen die eine Frühtoxizität nach der Bestrahlung aufweisen. Die Besonderheit der Dünndarmzellen liegt an der hohen Regeneration des Epithels durch einer ständigen Proliferation von Stammzellen. Deswegen, stellt der Dünndarm ein optimales Organ zur Analyse der DNA Schäden nach ionisierender Strahlung und der Reparaturmechanismen, die in den Enterozyten ablaufen, dar.

2.2 Aufbau des Darmes

2.2.1 Allgemeiner makroskopischer Aufbau und Funktion des Darmes

Der Darm fängt anatomisch am Pylorus an und reicht bis zum After. Seine Funktion ist sowohl die Absorption der Substanzen aus der Nahrung, die für die Funktionen des Körpers elementar sind, als auch die Ausscheidung.. Makroskopisch teilt man den Darm in den Dünndarm und den Dickdarm. Während der Dünndarm hauptsächlich für die Verdauung und Absorption von Nährstoffen zuständig ist, ist die Hauptfunktion des Dickdarms die Ausscheidung (Smollich, Michel, 1992).

Der Dünndarm besteht weiter aus drei verschiedenen Abschnitten, nämlich das Duodenum, das direkt am Pylorus anfängt, das Jejunum und das Ileum, das in Verbindung mit dem Dickdarm steht. Der Dickdarm besteht auch aus drei Abschnitten, das Caecum, das Colon und das Rektum.

2.2.2 Die Histologie des Dünndarms

Histologisch besteht die Wand des Dünndarms aus vier Abschnitten. Beginnend von außen befindet sich zuerst die Tunica serosa, die Tunica muscularis, die Tela submucosa und zum Schluss die Tunica mucosa (Abb. 1). Die Tunica mucosa besteht selbst aus drei Teilen. Diese sind das Epithelium mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina muscularis mucosae (Smollich, Michel 1992).

Die Außenwand des Dünndarmes bildet die Tunica serosa, die in Kontakt mit dem Peritonealepithel steht und aus Mesothel, einer Lamina propria und einer Tela submucosa besteht. Die Tunica serosa ist reichlich vaskularisiert und enthält feine Nervenetze, elastische Elemente und Fetteinlagerungen.

Die Tunica muscularis folgt der Tunica serosa und ihre Aufgabe ist die Peristaltik des Darmkanals. Sie ist aus zwei Schichten glatter Muskulatur aufgebaut. In der äußeren Schicht laufen die Muskelfasern longitudinal während sie in der inneren Schicht zirkulär angeordnet sind. Diese zwei Schichten werden von dem Stratum intermusculare getrennt das aus elastischem Bindegewebe besteht. Im Stratum intermusculare befindet sich der Auerbach-Plexus (Plexus myentericus).

Weiter nach innen befindet sich die Tela submucosa, eine Schicht, die hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe besteht. Das Bindegewebe der Tela submucosa besteht aus kollagenen Faserbündeln, die scherengitterartig angeordnet sind. Außerdem enthält sie die größeren Blut- und Lymphgefäße sowie den Meissnerschen Nervenplexus.

Die Innenschicht des Dünndarms bildet die Tunica mucosa. Ihre Morphologie ist in den verschiedenen Abschnitten des Dünndarms unterschiedlich und diese Unterschiede sind besonders deutlich im Bereich des Epithelium mucosae.

Beginnend von außen trifft man zuerst die Lamina muscularis mucosae. Sie besteht aus glatten Muskelzellen, die die Konturveränderung der Mucosa erlauben. Die Lamina muscularis mucosae wird teilweise durch Drüsen und lymphoretikuläre Strukturen unterbrochen (Smollich, Michel, 1992). An der Lamina muscularis schließt sich die Lamina propria mucosae. Diese besteht aus elastischen und kollagenen Fasern. In der Lamina propria findet man auch Ansammlungen von

Immunzellen (T- und B-Lymphozyten, Eosinophile, Makrophagen, Mastzellen), sowie Blut- und Lymphgefäße, glatte Muskelzellen und Nerven. Der Lamina propria folgt zuletzt das Epithelium mucosae. Charakteristisch für den Dünndarm sind die fingerförmigen Zotten, die zu der Vergrößerung der Resorptionsoberfläche beitragen und die Krypten. Im Jejunum sind die Zotten am längsten und werden am Anfang des Duodenums und im Endteil des Ileums kürzer, bis sie am Übergang von Ileum zum Colon verschwinden. Das Epithelium mucosae ist mit einer großen Anzahl von Zellen mit unterschiedlichen Funktionen ausgestattet. Diese sind für die Resorption und die Verarbeitung von Nährstoffen zuständig sowie an der Immunantwort beteiligt

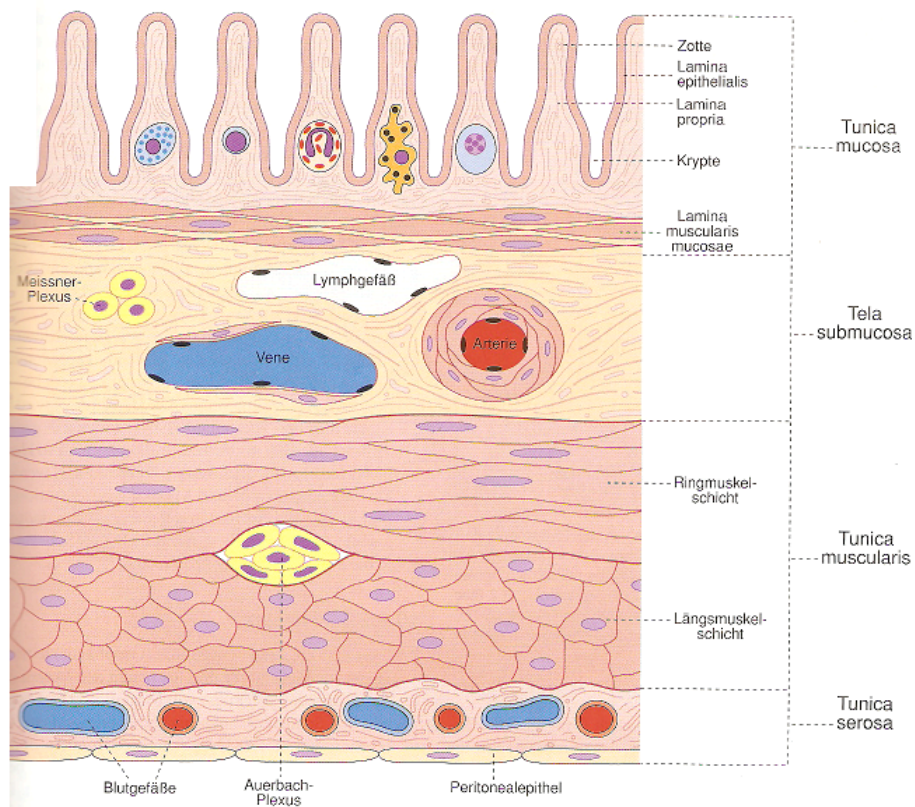


Abb. 1: Aufbau der Wand des Magen-Darm-Traktes am Beispiel des Dünndarms. Zellen sind in der Lamina propria vergrößert dargestellt. Von links nach rechts: Mastzellen, Lymphozyten, Eosinophile, Makrophagen, Plasmazellen. Bild aus Welsch Histologie, Verlag: Urban und Fischer.

2.2.3 Die Histologie des Epitheliums mucosae

In dieser Arbeit werden Zellen aus dem Epithelium mucosae des Dünndarms untersucht. Im Folgenden wird die Histologie dieser Zellen näher betrachtet. Es besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel, das sich aus Enterozyten, Becherzellen, endokrinen Zellen, M-Zellen und Paneth-Körnerzellen zusammensetzt. Bevor aber die einzelne Zellen des Epitheliums mucosae analysiert werden, ist wichtig die Morphologie der Zotten und Krypten zu betrachten.

Die Zotten bestehen aus der Epithelschicht der Lamina propria und werden von Blut- und Lymphgefäßen versorgt. Unter den Epithelzellen bildet sich ein subepitheliales Kapillarnetz (Abb. 2). Den Hauptanteil der Zellen die sich auf den Zotten befinden, machen die Enterozyten, gefolgt von den Becherzellen aus.

Zwischen den Zotten befinden sich die Krypten, auch bekannt als Lieberkuhn'sche Krypten. Diese sind unverzweigte tubuläre Drüsen deren Epithel mit dem Zottenepithel kontinuierlich zusammenhängt. In den Krypten befinden sich die Stamm- und Vorläuferzellen des Dünndarms, die für die ständige Regeneration des Epithels zuständig sind.

Den Hauptanteil der Zellen des Epitheliums mucosae bilden die Enterozyten. Sie befinden sich hauptsächlich auf den Zotten, sind durch Zonulae occludentes miteinander verbunden und haben die Aufgabe der Resorption der Nährstoffen. Die Enterozyten entstehen aus den Stammzellen, die sich in den Dünndarmkrypten befinden. Sie besitzen kugelförmige oder elipsoid geformte Kerne und tragen an ihrer apikalen Seite zahlreiche Mikrovilli. Die große Anzahl von Mikrovilli ist für die Vergrößerung von der Schleimhautoberfläche von großer Bedeutung. Die Mikrovilli enthalten Bündel längsgerichteter Aktinfilamente, die in den horizontal verlaufenden Anteilen des Zytoskeletts der Enterozyten verankert sind.

Zwischen den Enterozyten befinden sich die Becherzellen. Becherzellen sind Drüsenzellen die Glykoproteine produzieren Diese Glykoproteine bilden einen Schutz- und Gleitfilm über dem Dünndarmendothel. Histologisch besitzen die Becherzellen eine große Menge an Sekretgranula, was den Zellen ihre charakteristische Becherform gibt, während sich der Nukleus sowie der Hauptanteil der restlichen Zellorganellen in dem schmalen basalen Zellabschnitt befinden.

In den Lieberkuhn'schen Krypten befinden sich die enteroendokrinen Zellen die ein Teil des gastrointestinalen Hormonsystems sind. Sie sind hauptsächlich im Bereich der Kryptenbasis, einzeln oder in kleinen Gruppen angeordnet, und produzieren Hormone, die die Sekretion des Magens, des Pankreas und der Gallenblase beeinflussen.

Die Paneth-Körnerzellen, die sich ebenfalls in den Krypten befinden, sind Drüsenzellen, die an der Sekretion von Lysozym beteiligt sind. Eine andere Gruppe von Zellen die ebenfalls am Immunprozess der Darmschleimhaut beteiligt sind, sind die M-Zellen. Die M-Zellen gehen vermutlich aus unreifen Enterozyten hervor und ihre Hauptaufgabe besteht darin, Antigene aufzunehmen und sie transepithelial zu transportieren, so dass die immunkompetente Zellen des darmassoziierten Immunsystems mit diesen Antigenen in Kontakt treten (Smollich, Michel, 1992).

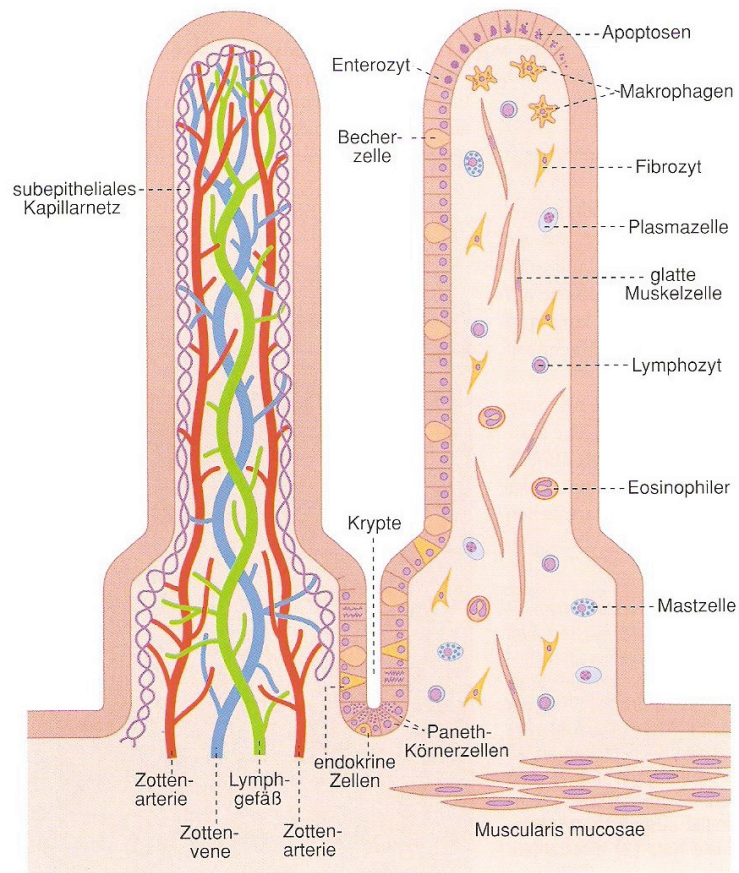


Abb. 2: Histologischer Aufbau der Tunica mucosa. Bild aus Welsch Histologie, Verlag: Urban und Fischer.

2.3 DNA-Doppelstrangbrüche

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind schwerwiegende Läsionen für die Zellen. Diese Läsionen können durch exogene Faktoren, aber auch durch intrazelluläre Prozesse, verursacht werden. Zu den exogenen Faktoren gehören Agenzien, wie zum Beispiel ionisierende Strahlung oder verschiedene chemotherapeutische Substanzen. Bei intrazellulären Prozessen entstehen DSBs zum Beispiel als Zwischenprodukt während einer Umstrukturierung von DNA-Sequenzen. Solche intrazellulären Prozesse sind zum Beispiel die DNA-Replikation und die V(D)J-Rekombination. Ein DSB entsteht, wenn gleichzeitig auf beiden komplementären DNA-Strängen Brüche entstehen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden. So ist die Chromatinstruktur nicht mehr in der Lage, die beiden Enden, die durch die DSB entstanden sind, zusammenzuhalten. Sollten sich mehrere Bruchenden in räumlicher Nähe befinden erhöht sich die Gefahr einer inkorrekten Rekombination mit anderen DNA-Ketten. Insbesondere nach ionisierender Strahlung kommt erschwerend hinzu, dass die Bruch-Enden der DNA teilweise Basenschäden, Einzelstrangbrüche oder einzelsträngige Überhänge am Bruchende aufweisen. Dies bewirkt, dass bei der Reparatur des DNA-Stranges eine Prozessierung der Bruchenden stattfindet, bzw. eine Änderung oder Umstrukturierung der Basensequenz des DNA-Stranges entsteht. Damit ist es verständlich, dass nicht oder fehlerhaft korrigierte DSBs zu einem Verlust von genetischen Informationen oder zu einem Rearrangement des Genoms führen können. Für die Zellen bedeutet das den Tod durch Apoptose oder eine onkogene Mutation.

2.4 Reparaturmechanismen von DNA-DSBs

Wegen der Gefahren, die durch die DSBs entstehen, ist es verständlich, dass die eukaryontischen Zellen über ein großes Spektrum an Reparaturvorgängen verfügen. Damit die Zellen diese Vorgänge ermöglichen, muss zuerst eine Aktivierungskaskade erfolgen (Abb. 3).

Als erstes in dieser Aktivierungskaskade reagieren die Sensor-Proteine, die in der Lage sind DSBs, oder Chromatinveränderungen zu entdecken. Anschließend erfolgt die Prozessierung der DNA Enden. Dieser Schritt ist nötig für die DNA Reparatur, weil die DNA-Enden aufgrund ihrer chemischen Natur, nach einem DSB nicht direkt als Substrat für die Reparaturmechanismen der Zelle zur Verfügung stehen. Es folgt die Aktivierung der Transducer-Proteine (Proteinkinase Kaskade), die das Schadenssignal zu den Effektoren weiterleiten. Die Transducers bilden einen Teil des Reparaturkomplexes, so dass die Erkennung und die Reparatur von DSBs miteinander

assoziiert ist. Die DSB Detektion muss sowohl sensitiv als auch spezifisch sein. Die Zelle muss in der Lage sein, wenige DSBs, oder auch nur einen einzelnen DSB, zu erkennen, und ihn zu reparieren. Zusätzlich ist es nötig, dass die Sensor Proteine inaktiv bleiben wenn keine DNA Schädigung vorliegt.

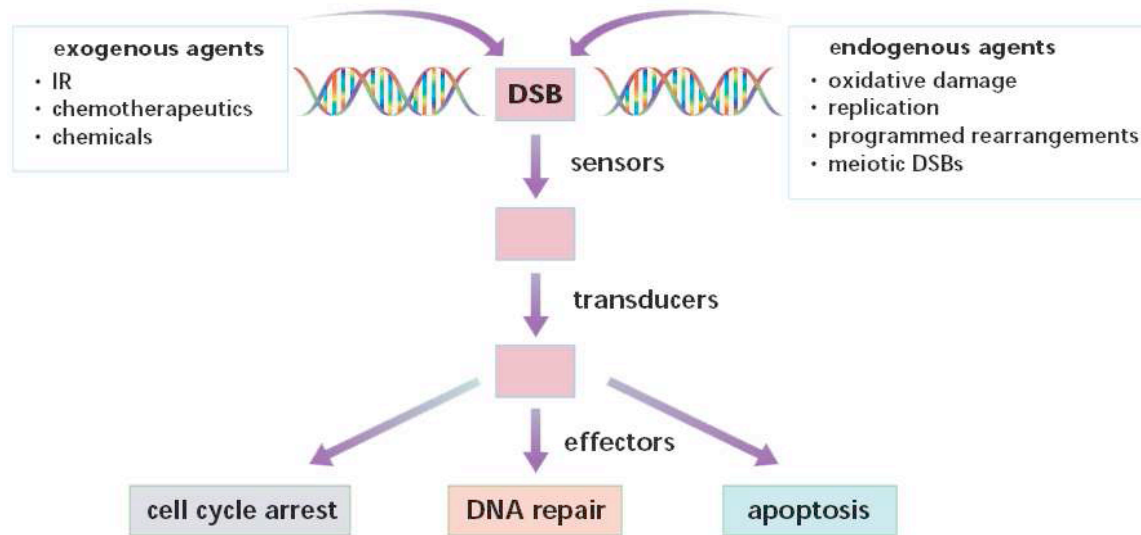


Abb. 3: verschiedene Proteine erkennen die DSBs und lösen eine Kaskade von unterschiedlichen Zellfunktionen aus. Dazu gehört die DNA-Reparatur und der Zelltod (Apoptose). Bild von Khanna et al., 2001.

Die zwei wichtigsten Reparaturmechanismen von DSBs, die die eukaryontischen Zellen besitzen, sind die homologe Rekombination (HR) und das nicht homologe Endjoining (NHEJ) (Abb. 4). Diese Mechanismen sind sehr unterschiedlich und jeder repariert die DSBs auf verschiedene Art und Weise.

Bei der homologen Rekombination werden DSBs korrekt repariert, indem die genetische Information, von einer ungeschädigten Schwesternchromatide direkt abgelesen und als Vorlage verwendet wird. Dafür sind große homologe DNA-Sequenzen nötig. Anders als bei der HR, repariert das NHEJ die geschädigte DNA, indem es zwei DSB-Enden verbindet, ohne dass große Sequenzhomologien vorliegen.

Die Wichtigkeit der beiden Reparaturmechanismen unterscheidet sich von Organismus zu Organismus. HR dominiert in der Reparatur von strahleninduzierten DSBs bei einfachen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. NHEJ findet bei Säugerzellen in allen Zellzyklusphasen statt, insbesondere auch in der G₀- und G₁-Phase. HR

übernimmt in Eukaryonten während der S- und G₂- Phase eine wichtige Funktion (Johnson und Jasin, 2000; Rothkamm *et al.*, 2003).

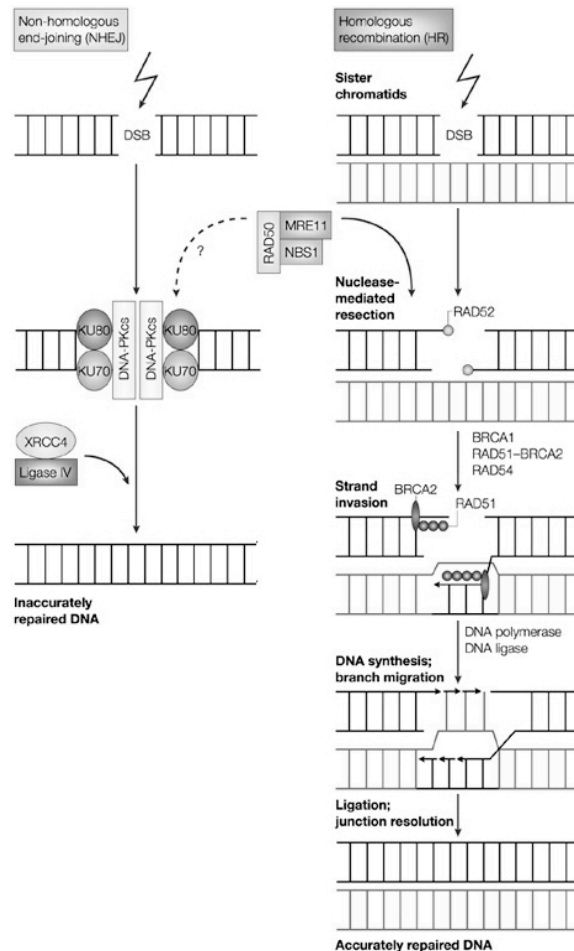


Abb. 4:

Der dominante Reparaturweg bei Säugetieren ist NHEJ. Das Ku70/Ku80 Heterodimer entdeckt die DSB und rekrutiert anschließend die DNA abhängige Proteinkinase (DNA-PK_{cs}). Die Aufgabe der DNA-PK_{cs} ist die Rekrutierung und Phosphorylierung von mehreren Proteinen. Die DSBs werden anschließend von der XRCC4-DNA-LigaseIV-Heterodimer repariert.

Die RAD51 Proteine der Epistasie Gruppe sind bei HR beteiligt. Zu denen gehören mehrere RAD51 Paraloge sowie RAD52, RAD54-Helikase und BRCA2. RAD52 bindet nach dem Zurückschneiden des Stranges, an die Bruchenden, während RAD51 ein Nukleoprotein-Filament am überstehenden Strang bildet. Der RAD51-BRCA2-Komplex spielt möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung dieses Prozesses und ist für die Strandinvasion und das Versetzen des Stranges essentiell. Anschließend wird die ungeschädigte Schwesternchromatide als Vorlage für die Reparatur des geschädigten DNA Teils benutzt. Die Proteine RAD51 und RAD54 sind für die obengenannten Prozeduren wichtig. Der MRE11-RAD50-NBS1-Komplex verursacht möglicherweise die anfängliche Prozessierung der DSB Enden. Bild aus Shiloh, 2003.

Ein nicht reparierter DSB kann zur Apoptose oder zum mitotischen Zelltod führen (Olive et al., 1998) während fehlerhaft reparierte DSBs, durch direkte oder verspätet induzierte chromosomale Rearrangements, ein Risiko für die Karzinogenese darstellen (Morgan et al., 1998).

2.4.1 Die Zellreaktion auf die DNA-Schädigung

Nach der Schädigung von DNA besitzen die Zellen eine Reihe von Mechanismen, um eine möglichst schnelle und effiziente Reparatur einzusetzen. Diese sind die Verlangsamung des Zellzyklus und die Phosphorylierung von Histonproteinen, so dass die DNA Reparatur erleichtert wird. Schließlich wenn die Reparatur nicht mehr möglich ist, kommt es zur Apoptose der Zellen. Die Entdeckung und die Initiierung dieser Mechanismen wird von einer großen Zahl von Proteinen durchgeführt, die zum größten Teil in Form von Komplexen zusammenarbeiten.

Ein Sensor entdeckt die entstandenen DNA Schäden und leitet ein Signal an eine Reihe untergeordneter Effektoren weiter. Die Reaktion von mitotisch-aktiven Zellen auf das Signal führt dazu, dass sie ihren Zellzyklus verlangsamen. So sind sie in der Lage, genug Zeit für die notwendigen Reparaturprozesse zu haben. Eine wichtige Stelle in diesem Prozess spielen die Zellzyklus-Checkpoints. In Eukaryonten besteht der Zellzyklus aus vier verschiedenen Phasen: Die G₁ Phase, die S Phase (Synthese), die G₂ Phase und die M Phase (Mitose). Wenn z.B. der DNA-Schaden während der G₂ Phase auftritt, wird der Eintritt in die Mitose verhindert, so dass die Gefahr von Chromosomenabberationen vermieden werden (Khanna und Jackson, 2001).

Essentiell für die DSB-Signal-Kaskade bei Säugetieren ist die Proteinkinase ATM (Ataxia teleangiectasia „mutated“) (Lavin und Khanna, 1999; Savitsky et al., 1995). ATM bindet an die DNA am Ort der DSB (Abb. 5) und wird dort aktiviert (Andegeko et al., 2001). ATM ist für die Phosphorylierung von mehreren „Downstream“-Elementen verantwortlich, zu denen p53, die Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2, sowie die BRCA1 und NBS1 gehören (Khanna und Jackson, 2001; Shiloh, 2003). Die phosphorylierten Proteine greifen dann in die DNA-Reparatur, in den Zellzyklus, und in die Apoptose ein.

Abgesehen von den zellzyklusabhängigen Antwortmechanismen auf DSBs, besitzt die Zelle auch zellzyklusunabhängige Aspekte der DNA-Schaden-Antwort Kaskade. Einer von diesen Aspekten ist die Änderung der Chromatinstruktur, die durch die Phosphorylierung der Histon-H2A-Isoform H2AX entsteht (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999). Diese Veränderung an der Stelle der DSB, begünstigt möglicherweise die Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren (Downs et al., 2000; Paull et al., 2000).

Der letzte Weg der DNA-Schadensantwort ist die Apoptose. Es sind nicht alle Details bekannt, wie die Zelle sich für oder gegen die Apoptose entscheidet, aber es scheinen auch Proteine beteiligt zu sein, die auch in anderen Bereichen der DNA-Schaden-Antwort Kaskade eine Rolle spielen (Rich et al., 2000).

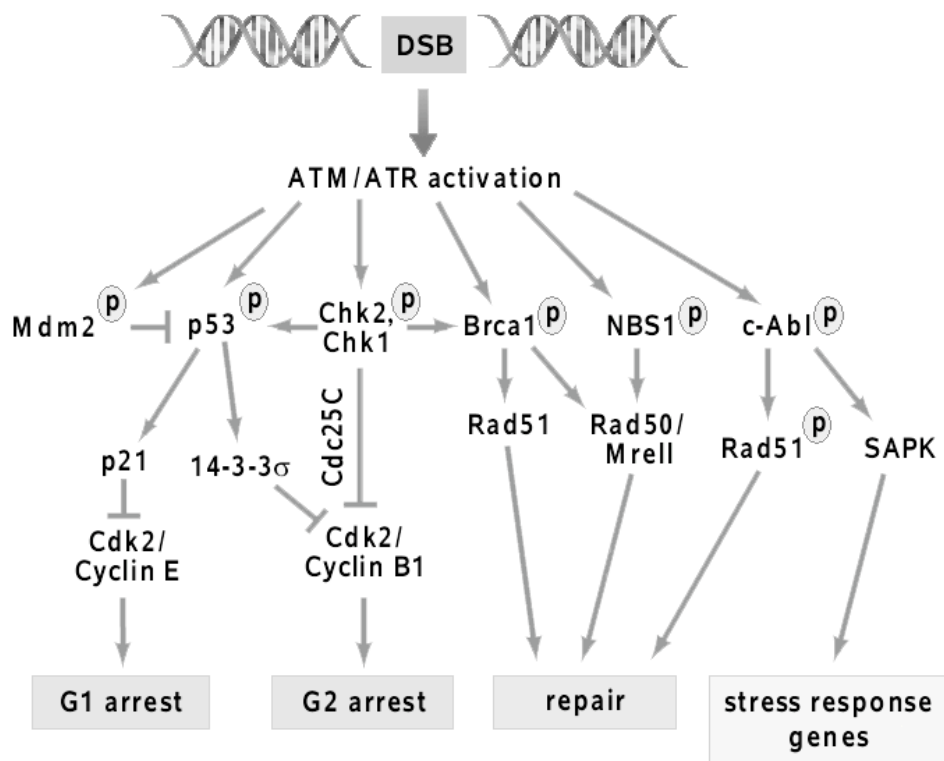


Abb. 5: ATM bindet an die Bruchstelle und gibt das Signal der DNA-Schädigung weiter. Zusätzlich phosphoryliert sie verschiedene „Downstream“-Elemente. Bild aus Jackson, 2001; Shiloh, 2003.

2.4.2 Homologe Rekombination (HR)

Die HR repariert DSBs fehlerfrei indem sie die entsprechende DNA-Sequenz des unbeschädigten Schwesternchromatids als Vorlage benutzt. So ist es verständlich, dass die HR ausschließlich während der späten S- und am Übergang zur M-Phase zum Einsatz kommt, da nur dann Schwesternchromatide vorhanden sind. Aufgrund der Fehlerfreiheit, und der Genauigkeit dieses Reparaturmechanismus, gilt die HR als prädominanter DNA-DSB- Reparaturweg in der frühen

embryonalen Wachstumsphase. Während dieser Phase findet eine sehr schnelle Zellteilung statt, was eine korrekte Reparatur erforderlich macht (West et al., 2003, Thacker et al., 2004, Orii et al., 2006).

Die HR erfolgt durch zwei Reparaturwege. Einer ist die DNA Doppelstranginvasion der homologen Schwesterchromatide und wird durch Proteine der RAD52-Epistasisgruppe vermittelt (Abb. 6) und der andere Weg ist das „Single Strand Annealing“ (SSA). Zu der RAD52 Gruppe gehören die Proteine RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 und XRS2 (Thompson und Schild, 1999, Wood et al., 2001).

Nachdem die DSBs erkannt wurden, beginnt die nukleolytische Prozessierung der gebrochenen DNA-Enden von 5' in 3' Richtung durch den RAD50-MRE11-XRS2 Komplex (bei Menschen ersetzt NBS1 das XRS2) (Jacson, 2002). Anschließend bindet das Protein RAD51 an dem einzelsträngigen Bereich mit dem 3'-Überhang (Baumann und West, 1998). Dieser Prozess wird von dem Replikations-Protein A (RPA), RAD52 und RAD54 unterstützt (Sung et al., 2000). Wenn RAD51 eine homologe Sequenz auf dem ungeschädigten DNA Molekül lokalisiert hat, kommt es zu einem Austausch der DNA Stränge, indem ein einzelsträngiger Bereich des geschädigten DNA Moleküls in die gesunde DNA-Doppelhelix eindringt und einen Strang ersetzt. RAD52, RAD54, RAD55, RAD57 (Baumann und West, 1998) und RPA (Petukhova 1998) beeinflussen den ganzen Prozess. Die Verlängerung des geschädigten DNA-Moleküls erfolgt durch die DNA-Polymerase, von dem 5'-Ende aus in Richtung 3'-Ende. Am Ende dieses Vorgangs entsteht die sogenannte Holiday-Junktion. Die Holiday-Junktion besteht aus zwei DNA-Doppelstränge und geht in die reparierte Schwesternchromatiden über.

Bei höheren Eukaryonten ist der Ablauf der HR komplizierter und es konnten mehrere RAD51-Paraloge (RAD51B, RAD51C, RAD51D), sowie andere Proteine mit schwächerer Homologie zur RAD51 (XRCC2, XRCC3) nachgewiesen werden (Wood et al., 2001).

Ein Zusammenhang zwischen HR und den Brustkrebs-Proteinen BRCA1 und BRCA2 wurde ebenfalls gezeigt. Es wird vermutet, dass BRCA2 und RAD51 einen Komplex bilden, der essentiell für die Stranginvasion und das Versetzen des Stranges bei der DNA-Synthese ist (Pellegrini et al., 2002; Yang et al., 2002). BRCA1 beeinflusst möglicherweise die HR, über Veränderung der Chromatinstruktur, oder indirekt unter Teilnahme an der Transkription, indem BRCA1 an Komplexe gebunden ist, die die Chromatin-Umstrukturierung oder die Transkriptionsvorgänge kontrollieren (Bochar et al., 2000; Scully et al., 1997).

Einen alternativen Weg zur HR stellt das SSA dar. Dabei kommt es nicht zur Bildung von

Holiday-Junktions, im Vergleich zur normalen HR. Trotzdem ist die homologe DNA-Sequenz für die SSA-Reparatur nötig. Für diesen Prozess sind Proteine der RAD52-Epistase-Gruppe nötig, wobei im Menschen dafür das menschliche RAD50, MRE11 und NBS1 verwendet wird (Karran, 2000).

Zusammenfassend spielt die HR eine sehr wichtige Rolle für die DNA Reparatur, besonders in Situationen wo eine korrekte Reparatur von DSBs benötigt wird. Der Verlust der HR bei Zellen von Vertebraten verursacht eine Störung der S-Phase dieser Zellen. Möglicherweise ist die DNA-Replikation nicht in der Lage an Orten zu starten, die endogene Schäden wie Einzelstrangbrüche aufweisen. Genauso hat ein Verlust von RAD51, BRCA1 und BRCA2 eine frühe Sterblichkeit in Mausembryonen und nicht lebensfähigen Zellgewebe-Kulturen zur Folge (Sharan et al., 1997).

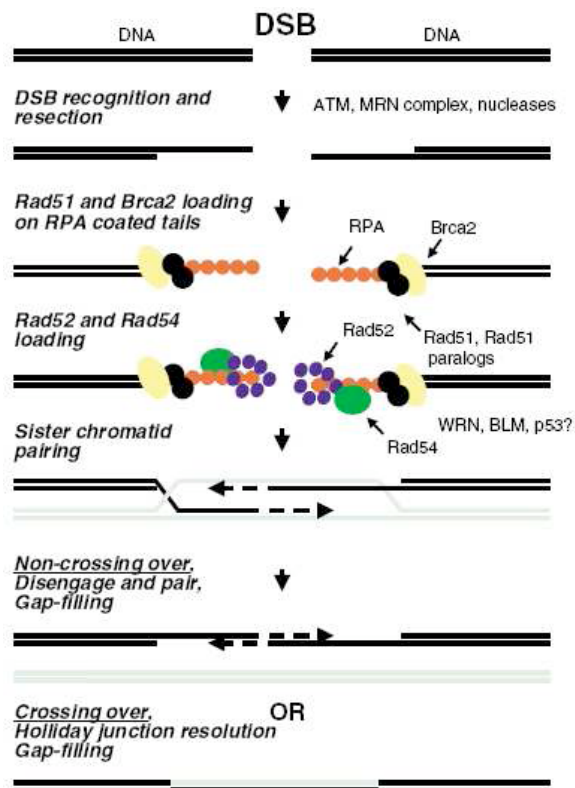


Abb. 6: Die Stadien der homologen Rekombination und der Einsatzort der verschiedenen Proteine. ATM erkennt und signalisiert den DSB. Die Schwesternchromatide dient als Vorlage. Auf der Stelle der Schädigung tragen Protein-Komplexe aus Rad50, MRE11 und NSB1/XRS2 (MRN-Komplex) zur Prozessierung der DNA-Stränge bei. Als nächstes kommt die DNA Replikation durch spezielle Proteine (z.B. Replikationsprotein A). Die homologe Sequenz wird lokalisiert und es werden mit Hilfe einer DNA-Polymerase die Informationen der Duplex-DNA kopiert und an das 3'Ende des beschädigten DNA Stranges angehängt. Bild aus Valerie et al., 2003.

2.4.3 Nicht homologes Endjoining (NHEJ)

Die Mehrheit der DNA-DSB Reparatur, die durch das NHEJ stattfindet, wird in der G₁/G₀ Phase der Zelle durchgeführt (Lee et al., 1997; Takata et al., 1998). Dieser Reparaturmechanismus benötigt keine homologen Chromosomen um die DSBs zu reparieren, ist er aber im Vergleich zur HR nicht fehlerfrei. Bei dem NHEJ werden beide Bruchenden eines DSBs modifiziert, so dass sie direkt ligiert werden können (Lee et al., 2003; Lieber et al., 2003; O'Driscoll et al., 2006) (Abb. 7). An diesem Prozess sind verschiedene Proteine beteiligt. Zu den wichtigsten gehört die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). DNA-PK besteht aus zwei Komponenten, dem Ku Protein und der katalytischen Untereinheit (DNA-PK_{cs}) (Jeggo, 1998; Smith und Jackson, 1999).

Das Ku Protein ist ein Heterodimer. Es bildet eine ringförmige Struktur, die an beiden DNA-Enden mit hoher Affinität bindet und sie wahrscheinlich vor nukleolytischer Degradation schützt (Taccioli et al., 1993). Möglicherweise erlaubt es die Bindung von anderen NHEJ Faktoren an die Bruchstelle und rekrutiert und aktiviert zusätzlich in Säugerzellen die DNA-PK_{cs} (Dvir et al., 1992; Gottlieb und Jackson, 1993). Das Ku Protein besteht aus den zwei Untereinheiten Ku70 (ca. 69 kDa im Mensch) und Ku80 (ca. 83 kDa im Mensch), die zur Stabilisierung des Proteins benötigt werden.

Die zweite Komponente der DNA-PK, die DNA-PK_{cs}, wird vom Ku-Komplex rekrutiert und aktiviert (Smith et al., 1999). DNA-PK_{cs} ist ein 465 kDa großes Polypeptid. Seine C-terminale Region hat Ähnlichkeiten mit den katalytischen Domänen der Proteine, die zu der Familie der Phosphatidyl-Inositol (PI)3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) gehören (Hartley et al., 1995; Smith und Jackson, 1999; Abraham, 2001). Zu dieser Familie gehört auch ATM (Ataxia teleangiectasia „mutated“), eine Proteinkinase, die essentiell für die DSB-Signal-Kaskade bei Säugetieren ist. DNA-PK_{cs} selbst hat Affinität zu einzelsträngigen DNA-Enden (Hammarsten et al., 2000; Martensson und Hammarsten 2002). Ein Ku-Heterodimer, das an die DNA bindet, verstärkt die Kinaseaktivität (Pang et al., 1997). Die DNA-PK_{cs} zeigt nach ihrer Bindung an der DNA, eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität. Substrate die wahrscheinlich zur DNA-PK_{cs} in vivo gehören sind XRCC4 (Critchlow et al., 1997) und der Replikationsfaktor A2 (Wang et al., 2001). Das NHEJ wird durch die Phosphorylierung dieser Faktoren erst möglich. Weitere Faktoren die an dem NHEJ beteiligt sind, sind die DNA-Ligase IV und das Protein XRCC4. Beide Proteine bilden gemeinsam einen Komplex, der die Bindung der DSB-Bruch-Enden erleichtert (Li et al., 1995; Critchlow et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass Ku-Protein den ganzen Prozess zusätzlich unterstützt, indem es den DNA-Ligase IV/XRCC4 Komplex rekrutiert (Ramsden und Gellert,

1998). Es ist oft der Fall, dass die DNA-Bruchenden modifiziert werden müssen, damit für die Bindung die notwendigen 5'-Phosphat und 3'-OH Enden vorhanden sind. Dafür gibt es eine Reihe von Enzymen, die potentiell eine Rolle bei diesem Prozess spielen (Lee et al., 2003).

Nukleasen, die ebenfalls eine Rolle beim End-joining spielen, sind das Werner-Syndrom-Protein (WRN), Artemis und MRE11. WRN ist eine RecQ ähnliche Helikase, die von Ku stimuliert wird, aber von der DNA-PK_{cs} inhibiert wird (Yannone et al., 2001).

Wahrscheinlich ist der MRE11-RAD50-NBS1 Komplex (MRN) an dem Reparaturprozess auch beteiligt. Er wird schnell rekrutiert und seine Funktion besteht darin, am Ort der DSBs an dem geschädigten DNA-Ende zu binden und die Reparatur zu unterstützen (Stracker et al., 2004; Moreno-Herrero et al., 2005). Obwohl die genaue Rolle des MRE11-RAD50-NBS1 Komplexes bei NHEJ noch unklar ist, ist es aufgrund seiner funktionellen Interaktion mit NHEJ und HR Proteine, ein wichtiger Faktor der DSB Reparatur (Carson et al., 2003; Uziel et al., 2003; Horejsi et al., 2004; Kobayasi et al., 2004; Lee et al., 2004).

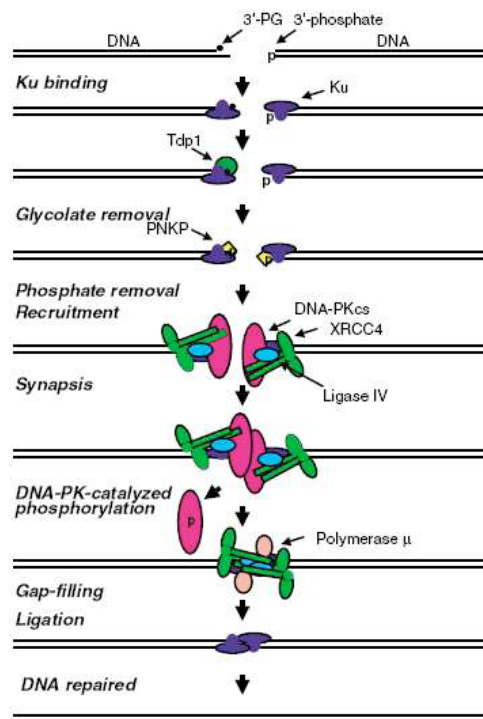


Abb. 7: Modell von NHEJ bei strahleninduzierten DNA-DSBs. Bild aus Valerie et al., 2003.

2.4.4 HR und NHEJ Interaktionen

HR und NHEJ, die zwei wichtigste Reparaturmechanismen, arbeiten nicht unbedingt getrennt voneinander, sondern sie kooperieren, um die entstandene DNA-Schädigung so korrekt wie möglich zu beheben (Richardson et al., 2000; Saintigny et al., 2001). Zum Beispiel besitzen die Zellen des SCID Mausstammes ein DNA-PKcs Defizit, was zu Problemen bei NHEJ-Reparaturmechanismen führt, so dass homologe Rekombinationen effizienter eingesetzt werden (Pluth et al., 2001).

Eine Interaktion zwischen ATM und DNA Brüchen am Ort der NHEJ und V(D)J Rekombination wurde nachgewiesen (Perkins et al., 2002) und so ist eine Verbindung von ATM mit NHEJ und V(D)J Rekombinationen wahrscheinlich.

Daraus resultiert, dass die verschiedenen Typen der DSB Reparatur miteinander interagieren und den Zellen eine gewisse Flexibilität erlauben, falls einer dieser Faktoren ausfällt.

2.4.5 ATM Proteinkinase

Eine der wichtigsten Komponenten der DSB Signalkaskade bei Säugerzellen ist die Proteinkinase ATM. ATM ist ein 370 kDa Protein, gehört wie die DNA-PKcs zur Familie der Phosphatidylinositol (PI)3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) (Savitsky et al., 1995) und besitzt eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität (Kim et al., 1999). Sie ist besonders bekannt für ihre Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus nach strahleninduziertem DSB-Schaden, was die G₁/S, intra-S, G₂/M Checkpoints beinhaltet (Shiloh et al., 2001; Kurz et al., 2004). Auch bei der Regulation und der Einleitung der Apoptose als Antwort der Zelle auf DSBs, nimmt ATM teil.

Inaktives ATM liegt in Form eines Dimers in der Zelle vor (Bakkenist und Kastan, 2003). Erst wenn durch ionisierende Strahlung DSBs induziert werden, aktiviert das eine ATM Molekül das andere, indem es einen Serin-Rest an der Position 1981 innerhalb der FAT-Domäne phosphoryliert. Das Dimer zerfällt in zwei Monomere die aktiv sind (Bakkenist und Kastan, 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass für die Aktivierung von ATM eher eine Veränderung der Chromatinstruktur, als die direkte Bindung des Proteins mit der geschädigte DNA verantwortlich ist (Bakkenist und Kastan, 2003).

Die Aktivierung von ATM ist auch verbunden mit zusätzlichen Faktoren wie zum Beispiel dem MRN Komplex (D' Amours et al., 2002; Petrini et al., 2003; Van de Bosch et al., 2003). In

Zellen, bei denen der MRN Komplex unterdrückt ist, kann die Lokalisation der DSBs durch ATM, beeinträchtigt sein. Ferner weisen diese Zellen eine verminderte Kinaseaktivität und Phosphorylierung von ATM Substraten auf (Carson et al., 2003; Uziel et al., 2003; Kitagawa et al., 2004; Lee et al., 2004; Difilippantonio et al., 2005).

ATM bewirkt ebenfalls eine Phosphorylierung von einer Reihe von „Downstream“-Substraten wie P53, MDM2, CHK1, CHK2, BRCA1 und NBS1, SMC1, die an der Zellzyklus Regulation beteiligt sind (Shiloh, 2003; Kastan et al., 2004).

Es wurde gezeigt, dass ATM hauptsächlich im Rahmen des langsamen Reparaturkomponente für die Beseitigung von DSBs wichtig ist (Riballo et al., 2004). So ist es verständlich, dass ein Teil der DSB-Verknüpfung (ca. 10%) über ein längeres Zeitintervall erfolgt und dazu ATM, Artemis und DNA-PK_{cs} notwendig sind. ATM Defizienz führt zum Krankheitsbild der Ataxia teleangiectasia einem neurodegenerativem Syndrom, das mit einer erhöhten Prädisposition für Krebserkrankungen beim Menschen assoziiert ist. Auf zellulärer Ebene führt ein solches Defizit zu einer erhöhten Strahlensensitivität und einer erhöhten Empfindlichkeit für Agenzien, die DSBs induzieren, aber interessanterweise kaum zu einer Hypersensitivität gegenüber anderen Formen der DNA Schädigung.

2.4.6 γ -H2AX

Bei Eukaryonten befindet sich die DNA in Form von Nukleosomen im Kern lokalisiert. Die Nukleosomen sind dann weiter auf höhere Strukturen organisiert, so dass am Ende die charakteristische Morphologie der Chromatide entsteht (Pruss et al., 1995). Mit Hilfe der Krystallographie war es möglich die exakte Struktur der Nukleosomen zu erforschen (Luger et al., 1997). Für die Bildung von Nukleosomen sind zwei Kopien von vier verschiedenen Histon-Proteinen notwendig. Diese Histon-Proteine sind H2A, H2B, H3 und H4 und sie bilden zusammen ein Oktamer das 145-147 DNA-Basenpaare enthält. Diese DNA-Basenpaare befinden sich um die Histone und stellen einen Nukleosomen-Kern dar, der eine molekulare Masse von ungefähr 207 kD besitzt. Bei Säugern werden die Histon-Proteine von verschiedenen Genen kodiert (Heinz et al., 1991). Die verschiedenen Mitglieder der H2B-, H3- und H4-Familie unterscheiden sich durch wenige Aminosäuren. H2A besteht aus drei Unterfamilien, von denen jede einzelne charakteristische Elemente in der Aminosäuresequenz besitzt, die separat im Laufe der Evolution der Eukaryonten konserviert wurden (West et al., 1980; Thatcher et al., 1994). Die drei H2A- Unterfamilien sind H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX.

Das H2AX Histon reagiert auf eine strahleninduzierte DNA Schädigung durch eine Phosphorylierung des Serins an der Stelle 139 (Rogakou et al., 1998; Sedelnikova et al., 2002).

Die Phosphorylierung von Histon H2AX, gehört zu einem der frühesten Prozesse, die nach der Entstehung von DSBs durchgeführt wird. Diese Phosphorylierung findet innerhalb von Minuten statt und führt zur Umwandlung von H2AX in γ -H2AX. Die Funktion von γ -H2AX besteht darin, Proteine auf die Bruchstelle zu rekrutieren, die für die Reparatur verantwortlich sind (Sedelnikova et al., 2003; Fernandez-Capetillo et al., 2004). Bei Menschen, Mäusen und Vertebraten nimmt das ATM Protein (Rogakou et al., 1998; Burma et al., 2001; Sedelnikova et al., 2002), das ATR Protein (Furuta et al., 2003) und/oder die DNA-PK (Park et al., 2003) bei der Phosphorylierung von γ -H2AX nach der Entstehung von DSBs aktiv teil (Stiff et al., 2004). Mit Hilfe von speziellen Fluoreszenz-Antikörpern, die für die γ -H2AX spezifisch sind, können die DNA-Brüche im Zellkern als charakteristische Foci unter dem Mikroskop, abgebildet und untersucht werden. Die Markierung von DSBs mit γ -H2AX stellt ein äußerst sensitives Verfahren für die Analyse der Reparatur dar, das auch eine Analyse der DSB Reparatur nach Strahlendosis in mGy Bereich zulässt (Rothkamm et al., 2003). Im Vergleich dazu benötigt die bisherige Analyse mit Hilfe der Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE), deutlich höhere Bestrahlungsdosen (50 Gy). γ -H2AX ist auf den Läsionen der DNA lokalisiert, die entweder durch ionisierende Strahlung (Burma et al., 2001) oder durch endogene Prozesse (Petersen et al., 2001; Mahadevalah et al., 2001) entstanden sind. In vitro Studien haben gezeigt, dass die Anzahl der γ -H2AX in unbestrahlten Zellen zellzyklusabhängigen Änderungen unterliegen (McManus KJ, Henzel MJ. 2005). Während die Zellen in die aktive Phasen des Zellzyklus eintreten, wird eine Erhöhung der γ -H2AX Foci Anzahl beobachtet, die nicht mit DSBs korreliert. So es wird vermutet dass γ -H2AX abgesehen von der Reparatur der DNA Schäden auch an der Miose teilnimmt.

2.5 DSB Reparaturprofiziente und –defiziente Mausstämmе

Diese Arbeit basierte auf der Untersuchung der DSB Reparatur bei reparaturdefizienten Mausstämmen wie SCID (severe combined immunodeficiency), BALB/c und A-T (Ataxia teleangiectasia) im Vergleich zu reparaturprofizienten C57BL/6 Mäusen, mit Hilfe der γ H2AX Foci Analyse.

SCID stellt eine genetische Mutation dar, die zu schweren immunologischen Defekten und DNA Reparatur Defiziten führt. Die Erkrankung ist durch eine Mutation auf dem Gen, das die DNA-

PK_{cs} kodiert, verursacht. Die DNA-PKcs ist eine wichtige Komponente des NHEJ, da sie für die Rekrutierung und Phosphorylierung von anderen Proteinen in der DNA Reparaturkaskade zuständig ist. Da NHEJ der dominante Reparaturmechanismus bei Säugetieren ist, verursacht ein Mangel an DNA-PK_{cs} eine Einschränkung der Fähigkeit, DSBs effektiv zu reparieren. Aus diesem Grund, weisen SCID-Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung auf.

Anders als bei SCID Mäuse, besitzen Balb/c Mäuse zwar die DNA-PKcs, aber diese ist durch zwei Polymorphismen im DNA-PK_{cs}-Gen in ihrer Funktion deutlich reduziert (Okayasu et al., 2000). Bei A-T Mäusen ist ein Defekt im ATM Protein nachzuweisen. Da ATM eine zentrale Rolle bei der Signalisierungs-Kaskade im DSB-Reparatursystem spielt (Löbrich et al., 2005), verursacht ihr Defizit eine erhöhte Strahlensensitivität, eine reduzierte DSB-Reparatur sowie eine erhöhte Prädisposition für maligne Erkrankungen. Das Krankheitsbild des A-T Defektes bei Menschen ist die Ataxia teleangiectasia und befällt verschiedene Organe des Körpers. Klinische Manifestationen sind die Teleangiektasie (Dilatation der Blutgefäße, häufig im Bereich der Augen und Ohren), die erhöhte Prädisposition für die Entwicklung von malignen Erkrankungen (60-180fach höher als in der normalen Bevölkerung), insbesondere von Leukämie, Lymphome und die progressive zerebelläre Ataxie. Die Ataxie entsteht durch das Absterben von Purkinje- und Granula-Zellen im Kleinhirn und die meisten Patienten sind im Alter von 10 Jahre rollstuhlpflichtig. Auf zellulärer Ebene, ist A-T durch eine erhöhte Strahlensensibilität charakterisiert. Die Gründe für die erhöhte Strahlenempfindlichkeit sind Chromosomenbrüche, Instabilität der Telomere, gestörte Zellzyklus-Checkpoints, Störung bei der Apoptose und Defekte bei der p35-Schadensantwort, die durch A-T Defekt entstehen (Lavin und Khanna, 1999; Shiloh und Kastan, 2001). Die Reparatur von DSBs in A-T Zellen ist weniger effizient im Vergleich zu reparaturprofiziente-Zellen (Blöcher et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass ungefähr 10% der strahleninduzierten-DSBs in A-T Zellen nach 24 h und auch noch nach 72h unrepariert verbleiben (Löbrich et al., 2000; Foray et al., 1997).

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Verwendete Mausstämme

Die verwendeten 12 Wochen alten Mäuse, C57BL/6 (wild-type, C57BL/6NCrl), BALB/c (BALB/cAnNCrl) und SCID (severe combined immunodeficiency, CB17/Icr-Prkdc scid/Crl) wurden von Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Homozygote A-T (129S6/SvEvTac-A-T-tm1Awb-/J, homozygous recessive *Atm*^{-/-}) Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor; Main, USA) bezogen. Die Tiere wurden entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und der Veterinärbehörde des Saarlandes gehalten. Die Mäuse wurden in Käfigen in keimfreien Räumen unter identischen Bedingungen (Temperatur $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $55 \pm 10\%$ und Licht-Dunkel Zyklen 12h:12h) gehalten. In jedem Käfig befanden sich 4 bis 5 Mäuse, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Alle Tiere wurden mit der Standardlabornahrung und -Wasser regelmäßig versorgt. Um das Stressniveau zu senken, wurden die Tiere eine Woche vor dem Experiment angeliefert, so dass sie eine Woche Zeit hatten, sich unter den oben genannten Bedingungen zu akklimatisieren.

3.2 Bestrahlungsplan

Für die Experimente bekamen die Mäuse eine homogene Ganzkörperbestrahlung. Um die Homogenität zu gewährleisten, wurde durch eine Bestrahlungsplanung sicher gestellt, dass 95% der 2 Gy Isodose, den ganzen Körper der Mäuse umschließt (Abb. 8). Für die Planung wurde das Programm ADAC Pinnacle three-dimensional treatment planing system verwendet und die Mäuse befanden sich für die dazu benötigte Computertomographie in Narkose (Abb. 9). Für die Bestrahlung wurde ein spezieller Zylinder aus Plexiglas mit ein Innendurchmesser von 20 cm und einem Deckel zur Reduzierung der Mausebewegungen, in Höhe von 5cm verwendet. Dieser Deckel besteht aus einem Gewebe-äquivalenten Plastikmaterial von 1,5 cm Dicke und sorgt für eine Homogenität der Bestrahlungsdosis.

Die Bestrahlungsbedingungen sind die Folgenden: Strahlungsenergie: 6 MeV Photonen; Dosis: 2.0 Gy/min; Quelle-Haut-Abstand: 99cm; Größe des Bestrahlungsfelds: 30cm x 30cm. Für die DSB Induktion, wurde Dünndarmgewebe von C57BL/6 10 Minuten nach Bestrahlung mit 0.1, 0.5 und 1.0 Gy analysiert.

Um die DSB Reparaturkinetik zu bestimmen wurden C57BL/6, Balbc, A-T und SCID Mäuse mit 2 Gy bestrahlt und das Dünndarmgewebe nach 0.5, 2.5, 5, 24 und 48 Stunden analysiert und mit der entsprechenden Kontrollgruppe scheinbestrahlter Mäuse verglichen (Tab. 1).

Mausstamm	Dosis (Gy)	Zeitpunkt (h)
C57BL/6	2	0.5/2.5/5/24/48
	0	Kontrolle
Balb/c	2	0.5/2.5/5/24/48
	0	Kontrolle
A-T	2	0.5/2.5/5/24/48
	0	Kontrolle
SCID	2	0.5/2.5/5/24/48
	0	Kontrolle
C57BL/6	0.1/0.5/1.0	0.1
	0	Kontrolle
SCID	0.1/0.5/1.0	0.1

Tabelle 1: Studiendesign mit den verschiedenen Mausstämmen und Bestrahlungsdosen.

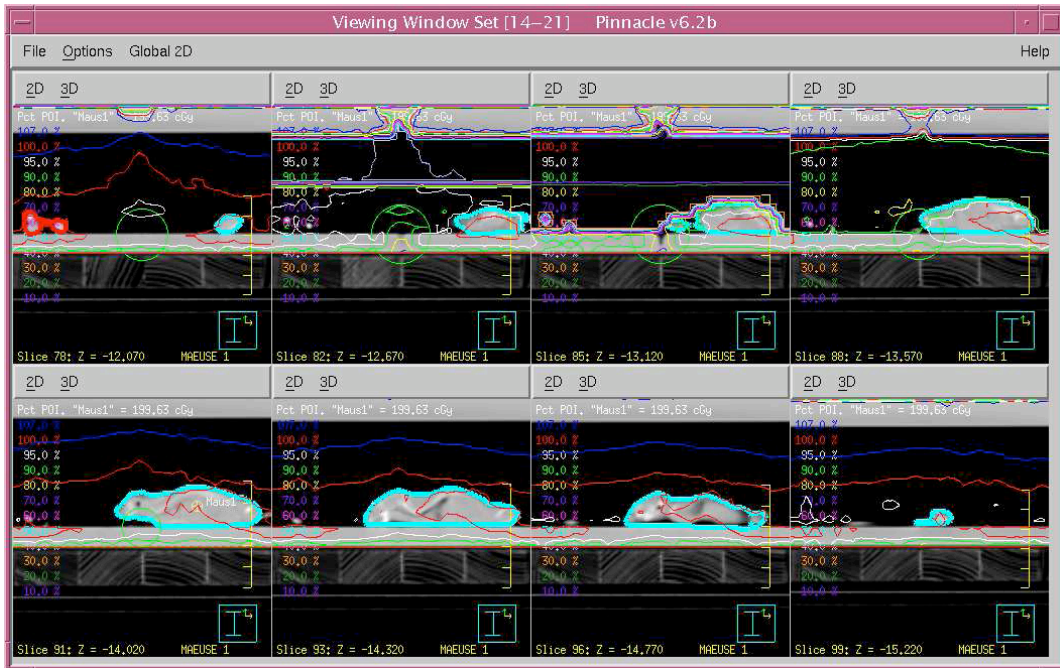


Abb. 8: Dosisverteilung in Mäusen dargestellt mit dem Pinnacle Programm.

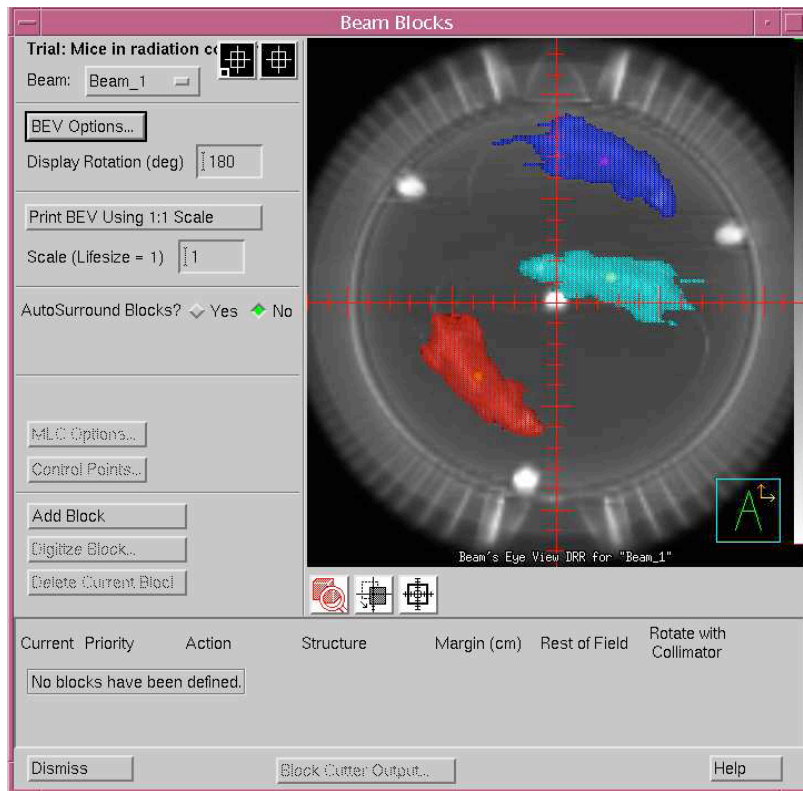


Abb. 9: CT-Planung von Ganzkörperbestrahlung dargestellt mit dem Pinnacle Programm.

3.3 Organentnahme und Herstellung der Gewebeschnitte.

Die Gewebegewinnung erfolgte nach der Narkotisierung der Mäuse. Für die Narkose wurde eine Mischung aus Rompun und Ketamin (Rompun 1 ml und Ketamin 0.75 ml, verdünnt in 8.25 ml 0.9% NaCl-Lösung, 0.1 ml/ 10 g) intraperitoneal injiziert. Nach der Blutentnahme, durch eine direkte Punktion des linken Herzventrikels, erfolgte innerhalb von 4 bis 7 Minuten die weitere Entnahme von Lunge, Milz, Nieren, Herz, Darm und Gehirn (erster Reparaturzeitpunkt 30 min, bei der Kinetik 10 min). Jedes Organ wurde sofort in einer 0.4% gepufferten Formaldehyd-Lösung eingetaucht, und bei Zimmertemperatur über Nacht aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der entnommenen Organe in einer eingestufteten Ethanol- und Xylen-Lösung, und das Einbetten in Paraffin. Zum Schluss wurden die Organpräparate in 4 µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträger aufgezogen.

3.4 γ -H2AX Immunfluoreszenz-Färbung

Um die Färbung vorzubereiten musste das Paraffin entfernt und die Gewebeschnitte rehydriert werden. Dazu wurde folgende Prozedur durchgeführt: zwei Spülungen mit Xylen (jeweils 10 min), gefolgt von einer absteigenden Ethanol Reihe (100% Äthanol, 96% Äthanol, 90% Äthanol, 80% Äthanol und 70% Äthanol Spülungen (jeweils 2 min)) und anschließende Spülung mit H₂O für 1 min. Um die Antigen-Stellen zu demaskieren, wurden die Präparate 60 min lang mit Citrat-Pufferlösung (DAKO Retrieval puffer, #S-2031, Glostrup, Dänemark pH 6.0) auf 96° C erhitzt. Nach einer 5 minutigen Waschenbett mit PBS wurden die Präparate mit normalem Ziegen Serum (cat. #642921 ICN, Irvine, CA, USA) bei Zimmertemperatur für 60 min überschichtet, damit eine Blockade der nicht-spezifischen Bindungsstellen stattfinden kann. Es folgte die Inkubation der Gewebe mit einem primären monoklonalen Maus Antikörpern gegen γ -H2AX (antiphospho-H2AX [Ser 139]; Upstate Biotechnology, Lake Placid) mit einer Verdünnung von 1:1600 in PBS in einer befeuchteten Kammer bei 4 °C über Nacht. Die Präparate wurden danach mit biotinierten Alexa Fluor 488 konjugierten sekundären Ziegen anti-Maus Antikörpern IgG (Invitrogen, cat. #A11001, Karlsruhe, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS in einer feuchten Kammer für 60 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI, das Einbetten der Gewebeschnitte in Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) und ihre Aufbewahrung bei 4° C im Dunkeln. Zwischen den jeweiligen Stadien der Färbung wurde eine Spülung mit PBS (3x10 min) durchgeführt.

3.5 Quantifizierung von γ -H2AX Foci

Die Dünndarm-Präparate wurden unter dem Mikroskop und bei 60- und 100-facher Vergrößerung untersucht und die Anzahl der γ H2AX Foci quantitativ erfasst. Die Fluoreszenz Bilder wurden mit Hilfe der Nikon-Epifluoreszenz Mikroskops, ausgerüstet mit einer CCD-Kamera (charge-coupled device) und einer Erfassungs- und Auswertungs-Software (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen (Abb. 10). Alle Zellen des Dünndarmgewebes der vier Mausstämme (C57, Balbc, SCID und A-T) wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten analysiert, und mindestens 100 Zellen pro Präparat auf DSBs Foci untersucht.

3.6 Statistik

Um die Unterschiede der DSB Reparaturkinetik zu jedem Zeitpunkt (0.5 h, 2.5 h, 5 h, 24 h, 48 h nach Bestrahlung) zu evaluieren, wurde eine multivariante Varianzanalyse der Daten mit Bonferroni Post-Hoc Test verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde die statistik Software statistical package for social science version 15 (SPS Chicago, IL) benutzt. Das Kriterium für die statistische signifikanz war $p \leq 0,05$.

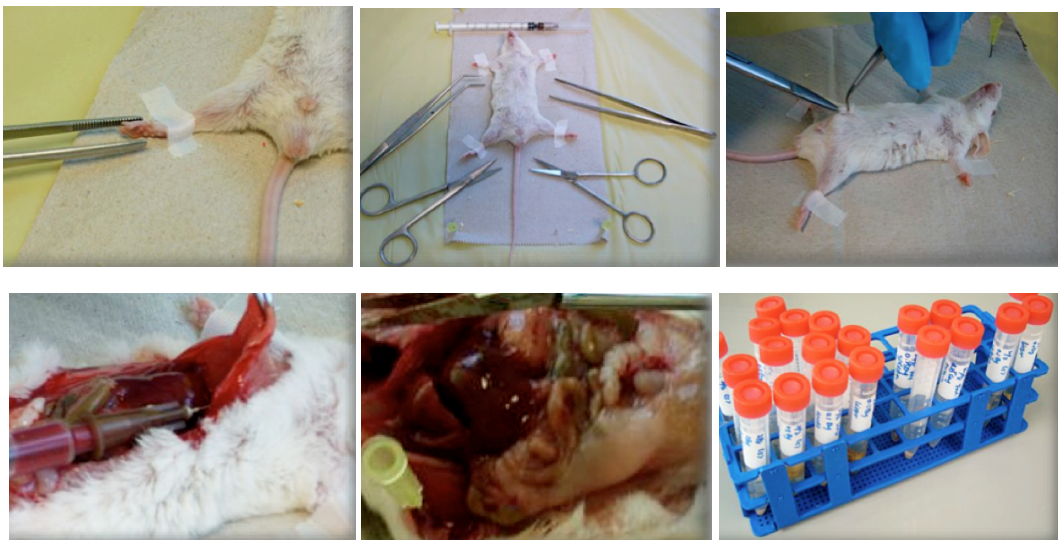


Abb. 10: Die Entnahme der Organe und ihre Konservierung

4. ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war, die Induktion von DSBs im Dünndarmgewebe, nach Exposition auf ionisierende Strahlung zu messen sowie die Untersuchung der DSBs Reparatur bei verschiedenen Mausstämmen. Für diesen Zweck wurden ausschließlich Zellkerne von Enterozyten unter dem Mikroskop auf Foci untersucht. Andere Zellen des gastrointestinalen Traktes so wie Zellen des Immunsystems wurden von der Messung ausgeschlossen. Ausgewählt wurden hauptsächlich Zellen der Dünndarm Zotten, weil dort die ausdifferenzierten Enterozyten am besten zu untersuchen waren, wobei sich in den Krypten die Stamm- und Vorläuferzellen unter ständiger Mitose befinden. Die Untersuchung der Dünndarmzellen war nicht in allen Regionen möglich, denn es fanden in vielen Abschnitten der Präparate eine Überlappung der Zellkerne statt. Ein anderer Faktor, der die Auswertung der Foci beeinträchtigt hat, war die intensive Färbung des gesamten Präparats, durch die Autofluoreszenz von Makromolekülen. In den meisten Fällen, war es allerdings möglich die Foci vom Hintergrund zu unterscheiden. Es gab jedoch Präparate, wo die Analyse der Foci dadurch unzuverlässig war. In solche Fälle wurden, wenn möglich, aus dem Gewebe neue Präparate erstellt und diese erneut unter dem Mikroskop analysiert.

Zum Vergleich ob eine Unterschied zwischen der Analyse unter 60-facher oder 100-facher Vergrößerung besteht, wurden die gleichen Präparate parallel mit beiden Vergrößerungsfaktoren untersucht. Die Messungen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Analyse unter 60-facher und unter 100-facher Vergrößerung (Abb. 11)

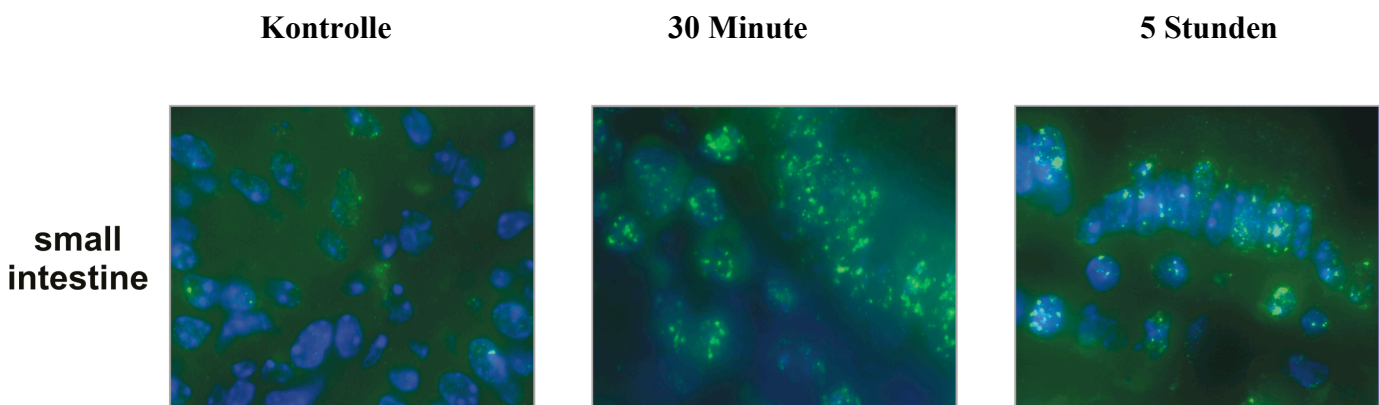


Abb. 11: γ H2AX Immunfluoreszenz im Dünndarm.

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte separat für die DSB Induktion und die DSB Reparatur. Die Ergebnisse der verschiedenen Mausstämmen wurden dann miteinander verglichen, so dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen bezüglich des Reparaturverhaltens dargestellt werden konnte.

4.1. DSB Induktion im Dünndarmgewebe

Für die DSB Induktion wurden Mäuse von dem C57BL/6 Stamm und dem SCID Stamm mit 0.1 Gy, 0.5 Gy und 1.0 Gy bestrahlt und nach 10 Minuten der Dünndarm entnommen. 10 Minuten war das Minimum an Zeit, die nötig war, um die Organe der Mäuse nach der Bestrahlung zu präparieren. Nach der Färbung mit γ H2AX Immunfluoreszenz wurden die Präparate unter dem Mikroskop auf Foci untersucht. Bei der Durchführung der Experimente konnte nur eins der geplanten drei SCID Experimente tatsächlich durchgeführt werden. Das lag an Problemen während der Herstellung der Präparate. Die Überlappung der Zellkerne, sowie die intensive Hintergrundfärbung der Präparate, führte dazu, dass eine Foci Analyse entweder unmöglich oder so unsicher war, dass die Ergebnisse unzuverlässig waren.

Der Vergleich der Foci zwischen einem reparaturprofizienten Maustamm wie dem C57BL/6 Stamm und den SCID Stamm, der starke Defekte in der DNA Reparaturkaskade aufweist, zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl gebildeter Foci, die nach 10 min nachweisbar waren. Der Vergleich erfolgte auch parallel zwischen Zellen von verschiedenen Mausorganen, bei denen die Ergebnisse vergleichbar waren.

Beim C57BL/6 Stamm zeigte sich eine lineare Erhöhung der Focianzahl analog zur Erhöhung der Bestrahlungsdosis in allen Untersuchungen. Die Tabelle 2 zeigt die separaten Ergebnisse pro Untersuchung beim C57BL/6 Mäusestamm sowie den Mittelwert und die Standardabweichung. Bei der dritten Untersuchung war das Präparat von der jeweiligen Kontrollzellen nicht auswertbar. Es lag daran, dass die Zellkerne der Enterozyten im Präparat so stark überlappend waren, dass die Foci Analyse nicht möglich war. Das Diagramm in Abb. 12 zeigt das quantitative Verhältnis zwischen der Zahl von γ H2AX Foci pro Enterozyten-Zelle und der Bestrahlungsdosis. Dafür wurde der Mittelwert der Ergebnisse von C57BL/6 Mäuse benutzt um das lineare Verhältnis zwischen der Anzahl der Foci und der Bestrahlungsdosis deutlich zu erkennen.

Dosis	Foci Mittelwert	Standardabweichung SD	Untersuchung 1 Foci	Untersuchung 2 Foci	Untersuchung 3 Foci
0 Gy	0.08	0.01	0.07	0.08	nicht auswertbar
0.1 Gy	0.79	0.04	0.83	0.79	0.75
0.5 Gy	4.23	0.28	4.21	4.52	3.95
1.0 Gy	7.98	0.60	8.45	7.30	8.18

Tabelle 2: Die Ergebnisse der DSB Induktion bei C57BL/6 Mäusen.

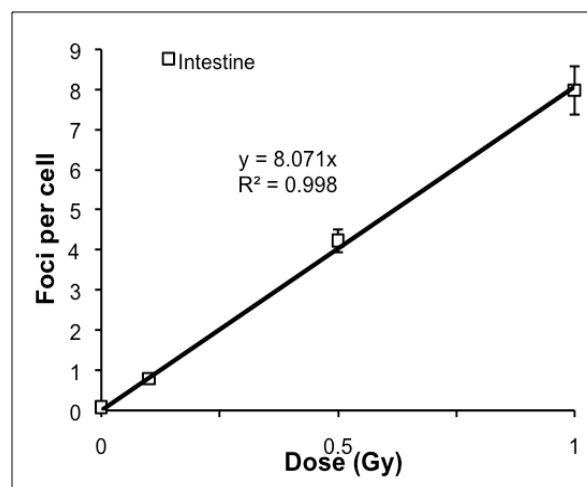


Abb. 12: DSB Induktion in Dünndarmzellen bei C57BL/6 Mäusen. Die Präparate wurden 10 min nach der Bestrahlung gefärbt und untersucht.

Bei der Analyse der DSB Induktion in SCID Mäuse war, wie bereits erwähnt nur bei einer Untersuchung die Auswertung möglich. Dabei zeigte sich ähnlich wie bei den C57BL/6 Mäusen eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der Foci und der Bestrahlungsdosis. Sogar die Menge der Foci im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen zeigte keinen großen Unterschied. Das gleiche Verhältnis zeigten auch die Zellen von anderen Mausorganen. Die Tatsache dass die Induktion keine großen Unterschiede zeigte, liegt eher daran, dass die DNA Reparatur noch nicht vollständig begonnen hatte, so dass die Defizite von SCID Mäuse manifest wurden. Die Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse bei der DSB Induktion im SCID Mausstamm.

Dosis	Foci
0.1	1.01
0.5	4.76
1.0	9.23

Tabelle 3: Die Ergebnisse der DSB Induktion bei SCID Mäusen.

4.2. DSB Reparatur in verschiedenen Mausstämmen

Die DSB Reparatur bei verschiedenen Mausstämmen wurde bestimmt, indem die Mäuse mit 2 Gy bestrahlt wurden und nach 30 min, 2.5 h, 5 h, 24 h und 48 h der Dünndarm entnommen und auf Foci untersucht wurde. Für diesen Zweck wurden Mäuse aus vier verschiedenen Mausstämmen benutzt und zwar die reparaturprofizienten C57BL/6, Mäuse, die Balb/c Mäuse, die A-T Mäuse und die SCID Mäuse. Nach der Herstellung der Präparate wurden die Zellkerne des Dünndarms unter dem Mikroskop mit 60-facher und 100-facher Vergrößerung untersucht.

Die Reparaturantwort auf DSB war bei den C57BL/6 Mäuse am effektivsten. Dies manifestierte sich mit einer rapiden Reduktion der Foci Anzahl zum späteren Zeitpunkt der Untersuchung.

Reparaturzeit (h)	Foci /Zelle Mittelwert	Standardabweichung SD	Untersuchung 1 Foci/Zelle	Untersuchung 2 Foci/Zelle	Untersuchung 3 Foci/Zelle	Untersuchung 4 Foci/Zelle
0.5	10.7	0.85	10.44	11.96	10.17	10.23
2.5	8.19	0.13	8.30	8.03	8.15	8.30
5	4.79	0.21	4.87	5.04	4.56	4.69
24	0.70	0.32	0.43	1.13	0.76	0.48
48	0.29	0.08	-	0.25	0.39	0.25
Kontrolle	0.1		nicht auswertbar	0.06	0.11	0.15

Tabelle 4: Ergebnisse der DSB Reparatur bei C57BL/6 Mäusen.

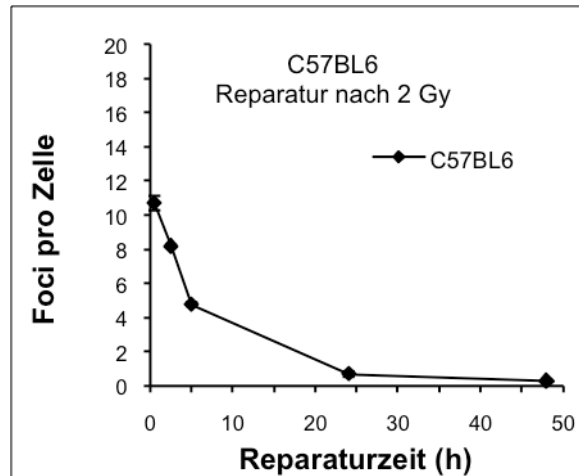


Abb. 13: Reparaturkinetik bei den C57BL6 Mäusen.

Anschließend wurden die Balb/c Mäuse in Bezug auf die DSB Reparaturkinetik untersucht. Die Korrelation zwischen der Reparaturzeit und der Foci Reduktion zeigte ein ähnliches Bild im Vergleich mit den C57BL/6 Mäusen, jedoch war die Anzahl der Foci zu allen Zeitpunkte im Vergleich zum C57BL/6 Mausstamm-Wert erhöht (Tab. 5).

Reparaturzeit (h)	Foci /Zelle Mittelwert	Standardabweichung SD	Untersuchung 1 Foci/Zelle	Untersuchung 2 Foci/Zelle	Untersuchung 3 Foci/Zelle	Untersuchung 4 Foci/Zelle
0.5	12.57	0.61	12.36	12.17	13.48	12.28
2.5	9.34	0.34	9.09	9.18	9.85	9.23
5	6.15	0.22	5.96	5.99	6.21	6.43
24	1.58	0.43	1.27	1.63	2.17	1.25
48	0.77	0.36	nicht auswertbar	0.54	1.19	0.58
Kontrolle	0.064		0.081	0.071	0.035	0.07

Tabelle 5: Ergebnisse der DSB Reparatur bei Balb/c Mäusen.

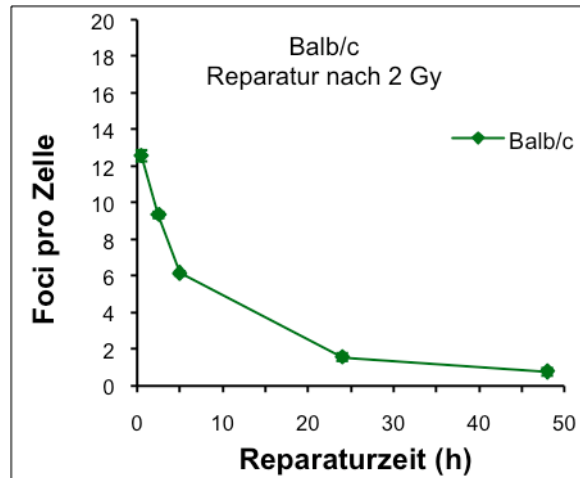


Abb. 14: Reparaturkinetik bei den Balb/c Mäusen.

Bei den A-T Mäusen zeigte die Reparaturkurve in den Frühzeiten eine ähnliche Foci Anzahl wie bei den Balb/c Mäusen und war entsprechend höher als bei den C57BL/6 Mäusen. In der Spätphase jedoch war die Reduktion der Foci bei den A-T Mäusen deutlich langsamer als bei den Balb/c Mäusen (Tabelle. 6).

Reparaturzeit (h)	Foci /Zelle Mittelwert	Standardabweichung SD	Untersuchung 1 Foci/Zelle	Untersuchung 2 Foci/Zelle
0.5	13.28	-	13.28	nicht auswertbar
2.5	9.32	0.09	9.381	9.25
5	7.18	0.08	7.12	7.23
24	3.03	0.05	2.99	3.06
48	1.79	0.35	1.54	2.04
Kontroll	0.095		0.1	0.09

Tabelle 6: Ergebnisse der DSB Reparatur bei A-T Mäusen.

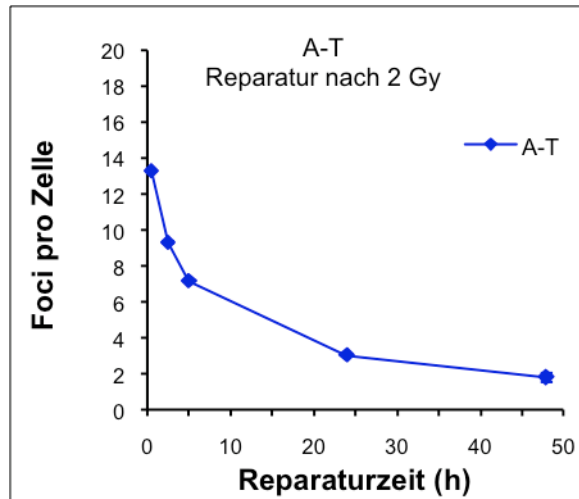


Abb. 15: Reparaturkinetik bei den A-T Mäusen.

Der letzte Mausstamm der bezüglich der DSB Reparaturkinetik untersucht wurde war der SCID Mausstamm. Die Ergebnisse der Reparaturkurve zeigten auch hier eine ähnliche Zeit/Foci-Reduktion mit den anderen Mausstämmen, jedoch war die Foci Anzahl zu allen Zeitpunkten der Reparatur deutlich höher als bei den anderen Mausstämmen (Tab. 7).

Reparaturzeit (h)	Foci /Zelle Mittelwert	Standardabweichung SD	Untersuchung 1 Foci/Zelle	Untersuchung 2 Foci/Zelle	Untersuchung 3 Foci/Zelle
0.5	15.83	0.71	16.32	15.02	16.16
2.5	11.14	0.36	11.26	10.73	11.42
5	8.22	0.33	8.21	7.89	8.55
24	4.55	0.16	nicht auswertbar	4.44	4.66
48	3.08	0.42	nicht auswertbar	3.38	2.78
Kontroll	0.19		0.1	0.25	0.23

Tabelle 7: Ergebnisse der DSB Reparatur bei SCID Mäusen.

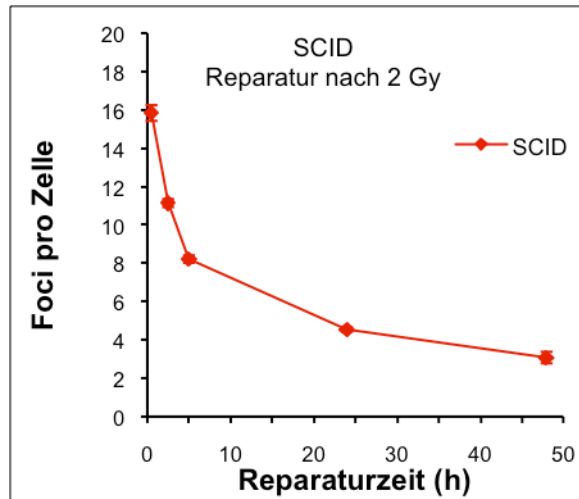


Abb. 16: Reparaturkinetik bei den SCID Mäusen.

Die Ergebnisse der Reparaturkurven zeigen, wie sich die unterschiedlichen Defekte in der Reparaturkaskade bei der Foci Reduktion widerspiegeln. Die C57BL/6 Mäuse die einen intakten Reparaturapparat besitzen, zeigten zu allen Zeitpunkten eine schnellere Foci Eliminierung. Die SCID Mäuse, die eine Mutation auf dem Gen, das die DNA-PK_{cs} kodiert aufweisen, zeigten eine längere Persistenz von Foci. Die Balb/c Mäuse haben aufgrund des Polymorphismus in dem DNA-PK_{cs} Gen eine erhöhte Anzahl von Foci zu allen Zeitpunkten der Untersuchungen im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen, aber eine bessere Eliminierung der Foci im Vergleich zu den SCID Mäusen. Interessant ist der Vergleich zwischen den Balb/c Mäusen und den A-T Mäusen. In den Frühzeiten ist die Foci Anzahl ähnlich, die Eliminierung der Foci aber zu den Spätzeitpunkten bei den Balb/c Mäusen höher als bei den A-T Mäusen. Dadurch lässt sich die wichtige Rolle des ATM Proteins bei der Spätphasenreparatur indirekt zeigen. Die Tab. 8 und die Abb. 17 zeigen die Unterschiede der Reparaturkinetik zwischen den verschiedenen Mausstämmen.

Reparaturzeit (h)	SCID	SD (SCID)	A-T	SD (A-T)	Balb/c	SD (Balb/c)	C57BL/6	SD (C57BL/6)
0.5	15.83	0.71	13.28	-	12.57	0.61	10.70	0.65
2.5	11.14	0.36	9.3155	0.09	9.34	0.34	8.19	0.13
5	8.22	0.33	7.18	0.08	6.15	0.22	4.79	0.21
24	4.55	0.16	3.03	0.05	1.58	0.43	0.70	0.32
48	3.08	0.42	1.79	0.35	0.77	0.36	0.29	0.08

Tabelle 8: Die Mittelwerte der Foci-Anzahl gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten.

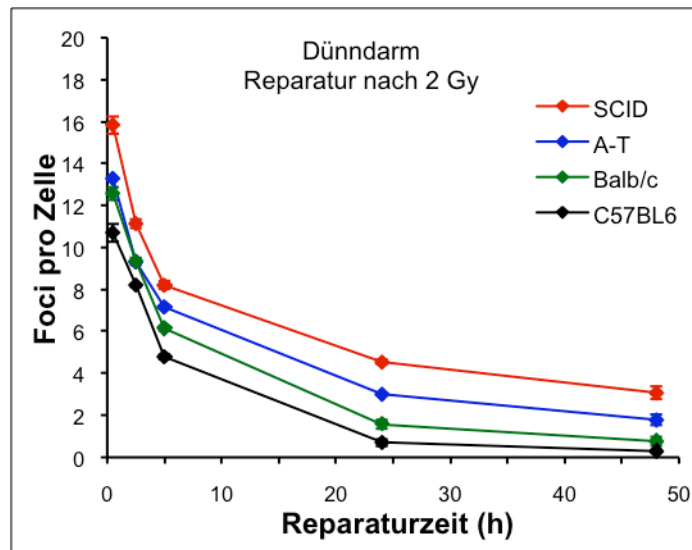


Abb. 17: Die DSB-Reparatur in den verschiedenen Mausstämmen

5. DISKUSSION

5.1 Die Interpretation der Foci in den Untersuchungen

Für die Messung der Foci wurde die Bildung von γ H2AX nach Bestrahlung mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurde der Mechanismus der Foci Entstehung sowie das Verhalten der Proteine, die an der DSB Stelle akkumulieren, berücksichtigt.

Durch eine Autofluoreszenz von Makromolekülen kann man eine Hintergrundfärbung beobachten, die aber aufgrund ihrer geringen Intensität spielte hier eine untergeordnete Rolle. Oft wird eine Zunahme der Foci-Größe, im Verlauf der DNA Reparatur beobachtet, was auf die Ausbreitung der DSB Reparaturkomplexe in die benachbarten Chromatinstrukturen zurückzuführen ist.

Zusätzlich soll das Verhalten der Reparaturproteine, im Bezug auf den Zellzyklus berücksichtigt werden. Die Entstehung und Persistenz von Foci hängt stark von der Chromatinorganisation ab. Obwohl Heterochromatin eine große Anzahl von DSBs aufweist, zeigt es zum Beispiel eine relativ geringe Bildung von γ H2AX Foci (Cowell et al. 2007; JA Kim et al. 2007). In der S-Phase ist jedoch durch die Replikation eine erhöhte Anzahl von γ H2AX Foci in den Heterochromatinregionen zu sehen, was auf die Veränderung der kompakten Struktur des Heterochromatins zurückzuführen ist (Chadwick and Lane 2005; Cowell et al. 2007; Rozenhak et al 2010; Szilard et al. 2010).

Die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an den DSB Stellen hängt von der Phase ab, in der sich die Zelle befindet. γ H2AX das für die Foci Analyse in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wird in allen Phasen des Zellzyklus eingesetzt. (Lisby et al. 2004; Bekker-Jensen et al. 2006) Zusätzlich, zeigte eine Analyse der Präparate mit Hilfe der Immunfluoreszenz von p53 (53 binding protein), welches ein hochsignifikantes Marker für die DSBs ist, eine identische Lokalisation der DSBs Foci von γ H2AX und p53 (Rübe et al., 2008). Diese identische Lokalisation demonstriert dass die gemessenen γ H2AX Foci bei den Untersuchungen zum größten Teil nur durch die Bestrahlung des Gewebes und nicht aus endogene DNA Umbauprozesse entstehen.

Man muss natürlich überlegen, dass die Anzahl der DNA-DSBs, die durch diese Methode gemessen wurde, etwas erhöht sein kann im Vergleich zu der Anzahl der tatsächlichen DNA-Läsionen. Das ist verständlich wenn man berücksichtigt, dass an manchen Stellen die

Fluoreszenzfärbung für einige Zeit nach der Reparatur noch sichtbar bleibt. Allerdings ist die Dauer dieser verlängerten Fluoreszenz so kurz, dass es für die Ergebnisse nicht signifikant ist. Es muss noch berücksichtigt werden, dass Dünndarmzellen zu den Zellen gehören, die eine hohe Proliferation aufweisen. Dementsprechend ist der Umbau der DNA in der Dünndarmzellen, besonders in den Stamm- und Vorläuferzellen im Vergleich zu den ausdifferenzierten Zellen von anderen Organen stark erhöht. Um den Einfluss der Zellproliferation auf die DNA und die Foci möglichst minimal zu halten, wurden in der vorliegenden Arbeit ausdifferenzierte Enterozyten aus der Zotten verwendet.

5.2 Analyse von γ H2AX als prädiktiver Test für die Radiosensitivität.

Es wurde bei den Untersuchungen die Reparaturkinetik der DNA bei verschiedenen Mausstämmen gemessen, die an unterschiedlichen Stellen der Reparaturkaskade Defekte aufweisen. Das Ziel der Arbeit war, dadurch die Sensitivität der DSB-Reparatur-Analyse mittels γ H2AX-Färbung von verschiedenen reparaturprofiziente und – defiziente Zellen zu vergleichen und parallel den Zusammenhang mit anderen Organen zu testen.

Um auszuschließen, dass ein Unterschied der initialen Foci Bildung von dem Typ des Mausstamms abhängig ist, wurde die Foci Anzahl nach DSB Induktion in reparaturprofizienten Mäusen mit reparaturdefizienten Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass in beiden Mausstämmen die Anzahl der Foci nach DSB Induktion gleich war. Daraus kann man schließen, dass die initiale Foci Anzahl in den verwendeten Mausstämmen identisch war und damit die Unterschiede der Foci Anzahl bei den Reparaturkinetik Untersuchungen, auf die DSB Reparatur selbst basierten.

Es wäre denkbar, dass reparaturprofiziente Mausstämme wie C57BL6, eine schnellere Eliminierung von Foci aufweisen, als Mausstämme die Defekte in der Beseitigung von DSBs zeigen, wie Balbc, SCID und A-T. Die Ergebnisse der Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit 2 Gy haben die Unterschiede der Reparaturfähigkeit bei den verschiedenen Mausstämmen demonstriert. So ist die Abnahme der Zahl der γ H2AX-Foci bei Zellen mit schweren Defekten in den Reparaturenzymen, wie z.B. bei SCID und A-T Mäuse, langsamer als bei Zellen mit weniger schweren (Balb/c) oder gar keinen Reparaturdefekten (Abb.12).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die γ -H2AX Immunfluoreszenz ein sehr sensitives Verfahren für die Erfassung von Defiziten im Reparaturmechanismus ist, auch wenn es sich nur um Genpolymorphismen handelt. So kann die γ -H2AX Immunfluoreszenz als „Screening“ Methode für die Entdeckung von DSB-Reparaturdefekte benutzt werden.

5.3 Vergleich der DSB-Reparatur in Organen mit unterschiedlicher Radiosensitivität

Die verschiedenen Organgewebe reagieren unterschiedlich auf ionisierende Strahlung. Manche Organe zeigen Schäden nach Bestrahlung in einer Dosierung in der andere Organe resistenter sind. Der Vergleich der Reparatur von DSBs in Dünndarmzellen, die eine hohe Proliferationsrate zeigen mit anderen Organen, deren Zellen zum größten Teil ausdifferenziert sind, stellt einen interessanten Aspekt dar um die Unterschiede in der Radiosensitivität zu verstehen. Die Ergebnisse zeigten interessanterweise, dass die Reparaturkinetik der ausdifferenzierten Enterozyten in allen Mausstämmen keinen signifikanten Unterschied aufweisen, im Vergleich zu der korrespondierten Reparaturkinetik von anderen Organen (Rübe et al., 2008). Dadurch wird vermutet dass die unterschiedliche Strahlungsempfindlichkeit der Organe sowie die Unterschiede in der Früh- oder Spättoxizität nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung, durch die Beeinträchtigung der Funktion der Stamm- und Vorläuferzellen und nicht der Enterozyten beeinflusst wird. Von großem Interesse ist die Frage, ob die Reparaturkinetik bei den Stamm- und Vorläuferzellen ähnlich wie bei den Enterozyten ist. Eine Analyse dieser Zellen mit der γ -H2AX Foci Färbung in vivo würde viele Informationen über das Verhalten der Zellen auf eine strahleninduzierte DNA-Schädigung liefern.

Ferner zeigte die Analyse der Reparaturkinetik in unterschiedlichen Organen wie wichtig die Reparatur-Proteine für die Reparatur der DSBs sind und somit wurde die zentrale Rolle der DSB Reparatur in allen Geweben für die Integrität und Fortpflanzung des genetischen Materials manifestiert.

5.4 Die Bedeutung der DSB Analyse mittels γ -H2AX Immunfluoreszenz

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Analyse der DSBs Reparaturkinetik in Enterozyten, mit Hilfe der γ -H2AX Immunfluoreszenz als „Screening“ Methode benutzt werden kann, um Gendefekte und die daraus resultierende DNA Reparaturdefekte präzise zu detektieren. Vergleicht man die Reparaturkinetik von ausdifferenzierten Enterozyten mit ausdifferenzierten Zellen anderer Organen (Rübe et. al, 2008), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Das demonstriert auch die zentrale Rolle der Hauptreparaturmechanismen in allen Organen. Daraus kann man vermuten, dass Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit in den verschiedenen Organen sowie die Frühtoxizität in Dünndarmgewebe nach der Einwirkung von ionisierender Strahlung, eher von der Reparaturkinetik der Stamm- und Vorläuferzellen abhängt, als von der Reparaturkinetik der ausdifferenzierten Enterozyten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

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

Adams, K E and Medhurst, A L and Dart, D A and Lakin, N D. (2006) Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* **25**: 3894-904.

Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA. (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3758–3763.

Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Schiloh Y, Rotman G. (2001) Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J.Biol Chem* **276**: 38224–38230.

Baumann, P. und West, S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double- stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 247-251.

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

Banath JP, Macphail SH, Olive PL. (2004) Radiation Sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* **64**:7144-9

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

Becker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J (2006) Spatial organisation of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* **173**: 195-206.

Blöcher, D., Sigut, D. und Hannan, M.A. (1991) Fibroblasts from ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assay by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* **60**: 791-802.

Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y.T., Lane, W.S., Wang, W.D., Kashanchi, F. und Shiekhattar, R. (2000) BRCA1 is associated with a human SW1/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* **102**: 257-265.

Boisvert FM, Dery U, Masson JY, Richard S. (2005) Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev* **19**: 671–676.

Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P. (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**: 287–299.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 42462–7

Calsou P, Frit P, Humbert O, Muller C, Chen DJ, Salles B. (1999) The DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Activity Regulates DNA End Processing by Means of Ku Entry into DNA. *J Biol Chem* **274**: 7848–7856.

Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G(2)/M checkpoint. *EMBO J* **22**: 6610–6620.

Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **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, Daniel Camerini-Otero R, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. (2002) Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* **296**: 922–927.

Chadwick BP, Lane TF. (2005) BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-Phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma* **114**: 432–439

Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ. (2002) Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev* **16**: 2333–2338.

Chappell C, Hanakahi LA, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, West SC. (2002) Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J* **21**: 2827–2832. 40

Chen MJ, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EY. (2001) ATM-dependent Phosphorylation of Human Rad9 Is Required for Ionizing Radiation-induced Checkpoint Activation. *Biol Chem* **276**: 16580–16586.

Chen L, Morio T, Minegishi Y, Nakada S, Nagasawa M, Komatsu K, Chessa L, Villa A, Lecis D, Delia D, Mizutani S. (2005) Ataxiatelangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage. *Cancer Sci* **96**: 134–141

- Chu G.** (1997) Double Strand Break.Repair. *J Biol Chem* **272**: 24097–24100.
- Chun HH, Gatti RA.** (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1187–1196.
- Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ.** (2007) gH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS ONE* **2**: e1057. Doi: 10.1371/journal.pone.001057
- Critchlow, S.E., Bowater, R.P. und Jackson, S.P.** (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* **7**: 588-598.
- Critchlow, S.E. und Jackson S.P.** (1998) DNA-endjoining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 394-398.
- Dasika GK, Lin SJ, ZhaoS, Sung P, Tomkinson A, Lee EY.** (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* **18**: 7883–7899
- D’Amours D, Jackson SP.** (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317–327.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G.** (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* **21**: 3192–3200.
- Demple B, Harrison L.** (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annu Rev Biochem* **63**: 915–948.
- Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F, Yang YP, Petukhova GV, Eckhaus M, Feigenbaum L, Manova K, Kruhlak M, Camerini-Otero RD, Sharan S, Nussenzweig M, Nussenzweig A.** (2005) Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* **7**: 675–685.
- Digweed M, Sperling K.** (2004) Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1207–1217.
- Douglas P, Sapkota GP, Morrice N, Yu Y, Goodarzi AA, Merkle D, Meek K, Alessi DR, Lees-Miller SP.** (2002). Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase *Biochem. J* **368**: 243–251.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F. und Jackson, S.P.** (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**: 1001-1004.
- Durocher D, Jackson SP.** (2001) DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* **13**: 225–231.

Dvir, A., Peterson, S.R., Knuth, M.W., Lu, H. und Dynan, W.S. (1992) Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11920-11924.

El-Andaloussi N, Valovka T, Toueille M, Steinacher R, Focke F, Gehrig P, Covic M, Hassa PO, Schar P, Hubscher U, Hottiger MO. (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell* **22**: 51–62.

Falck J, Coates J, Jackson SP. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**: 605–611.

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. (2004) H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**: 959–967

Fernandes N, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC, Price BD. (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem* **280**: 15158–15164

Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E.P., Arlett, C.F. und Malaise, E.P. (1997) Hypersensitivity of ataxia-telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**: 271-283.

Furuta T, Takemura H, Liao Z-Y, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induces by mammalian topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* **278**: 20303-20312

Girard PM, Foray N, Stumm M, Waugh A, Riballo E, Maser RS, Phillips WP, Petrini J, Arlett CF, Jeggo PA. (2000) Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome Cells Is Attributable to a Repair Defect and not Cell Cycle Checkpoint Defects1. *Cancer Res* **60**: 4881–4888

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

Goodarzi AA, Yu YP, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Harer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO Journal* **25**: 3880–3889

Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA. (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* **31**: 167-177

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

Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G. (2000) Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* **275**: 1541-1550.

Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W. und Jackson, S.P. (1995) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of Phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* **82**: 849-856.

Heintz, N. (1991) The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* **1088**: 327–339

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

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

Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J. (2004) Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* **23**: 3122–3127.

Huang J, Dynan WS. (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* **30**: 667–674.

Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA doublestrand breaks. *Nature* **432**: 406–411

Inamdar KV, Pouliot JJ, Zhou T, Lees-Miller SP, Rasouli-Nia A, Povirk LF. (2002) Conversion of Phosphoglycolate to Phosphate Termini on 3' Overhangs of DNA Double Strand Breaks by the Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase hTdp1. *J Biol Chem* **277**: 27162–27168.

Jackson, S.P. (2002) Commentary: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**: 687-696.

Jeggo PA. (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet* **38**: 185–218.

Johnson, R.D., Liu, N. und Jasin, M. (1999) Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* **401**: 397-399.

- Johnson, R.D. und Jasin, M.** (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J.* **19**: 3398-3407.
- Jongmans, W., Vuillaume, M., Chrzanowska, K., Smeets, D., Sperling, K. und Hall, J.** (1997) Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol. Cell Biol.* **17**: 5016-5022.
- Jorgensen, T.J. und Shiloh, Y.** (1996) The ATM gene and the radiobiology of ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **69**:527-537.
- Karran, P.** (2000) DNA double-strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 144–150
- Kastan MB, Bartek J.** (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**: 316–323.
- Khanna, K., Beamish, H., Yan, J., Hobson, K., Williams, R., Dunn, I. und Lavin, M.F.** (1995) Nature of G1/S cell cycle checkpoint defect in ataxia-telangiectasia. *Oncogene* **11**: 609-618.
- Khanna, K.K. und Jackson, S.P.** (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* **27**: 247-254.
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB.** (2004) Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM/NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* **18**: 1423–1438.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E. und Kastan, M.B.** (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **274**: 33538-37543.
- Kim, S.H., Kaminker, P. und Campisi, J.** (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* **23**: 405-412.
- Literatur
136
- Kim JA, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber JE.** (2007) Heterochromatin is refractory to H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* **178**: 209-218
- Klokov D, MacPhail SM, Banath JP, Byrne JP, Olive PL.** (2006) Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol.* **80**:223-229
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K. und Komatsu, K.** (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* **12**: 1846-1851.

- Kobayashi J, Antoccia A, Tauchi H, Matsuura S, Komatsu K.** (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)* **3**: 855–861.
- Kurz EU, Lees-Miller SP.** (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst.)* **3**: 889-900
- Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M.** (2004) A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Research* **64**: 500-508
- Lavin, M.F. und Khanna, K.K.** (1999) ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**: 1201-1214.
- Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N.** (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* **569**: 123–132.
- Lee S, Cavallo L, Griffith J.** (1997) Human p53 binds holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* **272**: 7532–7539.
- Lee JH, Paull TT.** (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**: 93–96.
- Lees-Miller SP, Meek K.** (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**: 1161–1173.
- Lee Y, McKinnon PJ.** (2006) Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. *Neuroscience*, DOI:10.1016/J
- Li, Z.Y., Otevrel, T., Gao, Y.J., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E. und Alt, F.W.** (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* **83**:1079-1089.
- Li B, Comai L.** (2002) Displacement of DNA-PKcs from DNA ends by the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* **30**: 3653–3661
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K.** (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 712–720
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R.** (2004) Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**: 699-713.
- Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC.** (2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* **303**: 243–246

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* **21**: 187–200.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution *Nature* **389**: 251–260

Luo, G.B., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A. und Petrini, J.H.J. (1999) Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development and sensitivity to ionizing radiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**: 7376-7381.

Lukas C, Falck J, Bartakova J, Bartek J, Lukas J. (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**: 255-260.

Löbrich, M., Rydberg, B. und Cooper, P.K. (1994a) DNA double-strand breaks induced by high-energy Neon and Iron ions in human fibroblasts. II. Probing individual NotI Fragments by hybridization. *Radiat. Res.* **139**: 142-151.

Löbrich, M., Ikpeme, S. und Kiefer, J. (1994b) DNA double-strand breaks measurement in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis: an approach using restriction enzymes and gene probing. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 623-630.

Löbrich, M., Rydberg, B. und Cooper, P.K. (1995) Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: Joining of correct and incorrect ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12050-12054.

Löbrich, M., Cooper, P.K. und Rydberg, B. (1996) Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**: 493-503.

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

Löbrich, M., Kühne, M., Wetzel, J. und Rothkamm, K. (2000) Joining of correct and incorrect DNA double-strandbreak ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes. Cancer* **27**: 59-68.

Löbrich M, Jeggo PA (2005) Harmonising the response to DSBs:a new string in the ATM bow. *DNA Repair* **4**: 749–59

Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C. (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *PNAS* **102**: 8984–8984

Löbrich M, Kiefer J. (2006) Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *Int J Cancer* **118**: 2652-6.

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

Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**: 271–276

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

Martensson S, Hammarsten O. (2002) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: structural requirements for kinase activation by DNA ends. *J Biol Chem* **277**: 3020-3029.

Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh CL, Schwarz K, Lieber MR. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* **16**: 701–713

Ma Y, Pannicke U, Lu H, Niewolik D, Schwarz K, Lieber MR. (2005) The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem* **280**: 33839–33846

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. (2002) Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* **108**: 781–794.

McKinnon PJ. (2004) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* **5**: 772–776.

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

Moreno-Herrero F, Jager M, Dekker NH, Kanaar R, Wyman C, Dekker C. (2005) Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* **437**: 440–443

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

Mori N, Matsumoto Y, Okumoto M, Suzuki N, Yamate J. (2001) Variations in Prkdc encoding the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) and susceptibility to radiation-induced apoptosis and lymphomagenesis. *Oncogene* **20**: 3609-19

Moshous D, Callebaut I, Chasseval D, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, De Villartay JP. (2001) Atermis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**: 177-186

Moynahan, M.E., Pierce, A.J. und Jasin, M. (2001) BRCA2 required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol. Cell* **7**: 263-272.

Nowak E, Etienne O, Millet P, Lages CS, Mathieu C, Mouthon MA, Boussin FD. (2006) Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res* **165**: 155-64.

Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA. (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* **20**: 2996–3003.

Nicolas, N., Finnie, N. J., Cavazzana-Calvo, M., Papadopoulo, D., Le Deist, F., Fischer, A., Jackson, S.P. und de Villartay, J.P. (1996) Lack of detectable defect in DNA double-strand break repair and DNA- dependent protein kinase activity in radiosensitive human severe combined immunodeficiency fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1118-1122.

Nicolas, N., Moshous, D., Cavazzana-Calvo, M., Papadopoulo, D., de Chasseval, R., Le Deist, F., Fischer, A. und de Villartay, J.P. (1998) A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J. Exp. Med.* **188**: 627-634.

O’Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P. (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell* **8**: 1175–1185.

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

Okayasu R, Suetomi K, Yu Y, Silver A, Bedford Joel S., Roger Cox, Robert L. Ullrich. (2000) A Deficiency in DNA Repair and DNA-PKcs Expression in the Radiosensitive BALB/c Mouse. *Cancer research* **60**: 4342-4345

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

Olive PL. (2004) Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol* **75**: 355-373.

Olive PL, Banath JP. (2004) Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 331-5.

- Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ.** (2006) Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 10017–10022.
- Pang, D., Yoo, S., Dynan, W.S., Jung, M. und Dritschilo, A.** (1997) Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.* **57**: 1412-1415.
- Pardo, B and Gomez-Gonzalez, B and Aguilera, A.** (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1039-56
- Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J.** (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res* **31**: 6819-6827
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. und Bonner, W.M.** (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**: 886-895.
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR.** (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51 -BRCA2 complex. *Nature* **420**: 287–293.
- Perkins EJ, Nair A, Cowley DO, Van Dyke T, Chang Y, Ramsden DA.** (2002) Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. *Genes Dev* **16**: 159–164.
- Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, et al** (2001) AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* **414**: 660–665.
- Petrini JH, Stracker TH.** (2003) The cellular response to DNA doublestrand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* **13**: 458–462.
- Petukhova, G. Stratton, S. und Sung, P.** (1998) Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* **393**: 91-94.
- Pierce AJ, Jasin M.** (2001) NHEJ deficiency and disease. *Mol Cell* **8**: 1160–1161.
- Pluth JM, Fried LM, Kirchgessner CU.** (2001) Severe combined immunodeficient cells expressing mutant hRAD54 exhibit a marked DNA double-strand break repair and error-prone chromosome repair defect. *Cancer Res* **61**: 2649–2655.
- Poinsignon C, de Chasseval R, Soubeyrand S, Moshous D, Fischer A, Hache RJ, de Villartay JP.** (2004) Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur J Immunol* **34**: 3146–3155

- Pruss D, Hayes JJ, Wolffe AP.** (1995) Nucleosomal anatomy--where are the histones? *BioEssays* **17**: 161–170
- Qvarnström OF, Simonsson M, Johansson KA, Nyman J, Turesson I.** (2004) DNA double strand break quantification in skin biopsies. *Radiother Oncol* **72**: 311-7.
- Ramsden, D.A. und Gellert, M.** (1998) Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO J.* **17**: 609-614.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W.** (2002) *Curr Opin Genet Dev* **12**: 162–169
- Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith G, Recio J-M, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson S, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M.** (2004) A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis and Proteins Locating to γ -H2AX Foci *Mol Cell* **16**: 715-724
- Rich, T., Allen, R.L. und Wyllie, A.H.** (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* **407**: 777-783.
- Richardson C, Jasin M.** (2000) Coupled Homologous and Nonhomologous Repair of a Double-Strand Break Preserves Genomic Integrity in Mammalian Cells *Mol Cell Biol* **20**: 9068–9075.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.** (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858-5868
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM.** (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**:905-916
- Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID.** (1999) The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* **17**: 56-72
- Rozenzhac S, Mejia-Ramirez E, Williams JS, Schaffe L, Hammond JA, Head SR, Russell P.** (2010). Rad3 decorates critical chromosomal domains with γ -H2AX to protect genome integrity during S-Phase in fission yeast. *PLoS Genet* **6**: e1001032
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M.** (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 5706–5715.
- Rothkamm K, Löbrich M.** (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5057–5062.
- Rouse J, Jackson SP.** (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* **297**: 547–551.

Rübe, Claudia E and Grudzenski, Saskia and Kuhne, Martin and Dong, Xiaorong and Rief, Nicole and Lobrich, Markus and Rube, Christian. (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* **20**: 6546-55

Rübe Claudia E., Xiaorong Dong, Martin Kühne, Andreas Fricke, Lars Kaestner, Peter Lipp, Christian Rübe (2008) DNA Double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J. Radiation Oncology Biol. Phys* **72**: 1180-1187

Saintigny Y, Delacote F, Vares G, Petitot F, Lambert S, Averbek D, Lopez BS. (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J* **20**: 3861–3870.

Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T. und Sfez, S. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI 3-kinase. *Science* **268**: 1749-1753.

Smollich, A. u. G. Michel (1992): Verdauungssystem. *Mikroskopische Anatomie der Haustiere*. 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, S. 108-185

Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W.J., Ye, L.Y., Young, R.A., Livingston, D.M. und Parvin, J.D. (1997) BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5605-5610.

Scully, R. und Livingston, D.M. (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**: 429-432.

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

Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. (2003) Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* **2**: 233–235.

Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. und Bradley, A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**: 804-810.

Shiloh Y. (2001) ATM and ATR: Networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin GENET Dev* **11**: 71-77

Shiloh Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155–168.

Shiloh, Y.und Kastan, M.B. (2001) ATM: genome stability, neuronal development and cancer cross paths. *Cancer Res.* **83**: 209-254.

Smith GC, Jackson SP. (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13**: 916–934

- Smith GC, Cary RB, Lakin ND, Hann BC, Teo SH, Chen DJ, Jackson SP.** (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc. Natl Acad Sci USA* **96**: 11134–11139.
- Smith J, Riballo E, Kysela B, Baldeyron C, Manolis K, Masson C, Lieber MR, Papadopoulos D, Jeggo PA.** (2003) Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Research* **31**: 2157-2167
- Stiff T, O’Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA.** (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX following exposure to ionising radiation. *Cancer Res* **64**: 2390–2396.
- Stucki M, Jackson SP.** (2004) MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* **3**: 953–957.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP.** (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**: 1213–1226.
- Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH.** (2004) The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst.)* **3**: 845–854
- Suh D, Wilson III DM, Povirk LF.** (1997) 3’-Phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends *Nucleic Acids Res* **25**: 2495–2500.
- Sung, P., Trujillo, K.M. und Van Komen, S.** (2000) Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **451**: 257-275.
- Szilard ,K, Jacques PE, Laramée L, Cheng B, Galicia S, Bataille AR, Yeung M, Mendez M, Bergeron M, Robert F, et al.** (2010) Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of γ -H2AX. *Nat Struct Mol Biol* **17**:299-305
- Taccioli, G.E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P.A. und Alt, F.W.** (1993) Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* **260**: 207-210.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S.** (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**: 5497–5508.
- Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR.** (2004) Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* **279**:2273-80

- Taylor AM, Groom A, Byrd PJ.** (2004) Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD): its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1219–1225
- Thacker J, Zdzienicka MZ.** (2004) The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1081–1090.
- Thatcher TH, Gorovsky MA.** (1994) Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* **22**: 174–179
- Thompson, L.H. und Schild, D.** (1999) The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochemie* **81**: 87-105.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y.** (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* **22**: 5612–5621.
- Van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF.** (2003) The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* **4**: 844–849.
- Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R.** (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**: 196–206
- Whalen, Mary K and Gurai, Sukhleen K and Zahed-Kargaran, Hengameh and Pluth, Janice M.** (2008) Specific ATM-mediated phosphorylation dependent on radiation quality. *Radiat Res.* **170**: 353-64
- Wang, H., Guan, J., Wang, H., Perrault, A.R., Wang, Y. und Iliakis, G.** (2001) Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res.* **61**: 8554-8563.
- Wang, H., Zeng, Z.-C., Perrault, A R., Cheng, X., Qin, W. und Iliakis, G.** (2001) Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **29**:1653-60.
- Wang J, Pluth JM, Cooper PK, Cowan MJ, Chen DJ, Yannone SM.** (2005) Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair (Amst)* **4**: 556–570
- Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, Leachman SA.** (2005) Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol* **124**: 807-817.
- West SC.** (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 435–445.
- West MHP, Bonner WM.** (1980) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* **19**: 3238–3245

- Williams RS, Tainer JA.** (2005) A nanomachine for making ends meet:MRN is a flexing scaffold for the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **19**: 724–726.
- Wiltzius JJ, Hohl M, Fleming JC, Petrini JH.** (2005) The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 403–407.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. and Lindahl, T.** (2001) Human DNA repair genes. *Science* **291**: 1284-1289.
- Wyman C, Ristic D, Kanaar R.** (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **3**: 827–833.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y.M., Yagi, T., Takata, M., Price, C., Kakazu, N. and Takeda, S.** (1999) Mre11 is essential for maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *EMBO J.* **18**: 6619-6629.
- Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H. and Pavletich, N.P.** (2002) BRCA2-Dss1-ssDNA structure. *Science* **297**: 1837-1848.
- Yannone SM, Roy S, Chan DW, Murphy MB, Huang S, Campisi J, Chen DJ.** (2001) Werner Syndrome Protein Is Regulated and Phosphorylated by DNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* **276**: 38242–38248.
- Yeo TC, Xia D, Hassouneh S, Yang XO, Sabath DE, Sperling K, Gatti RA, Concannon P, Willerford DM.** (2000) V(D)J rearrangement in Nijmegen breakage syndrome. *Mol Immunol* **37**: 1131–1139.
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P.** (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* **25**: 5363–5379.
- Yu T, MacPhail SH, Banath JP, Klovov D, Olive PL.** (2006) Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst)* **5**: 935-946
- Zhang X, Succi J, Feng Z, Prithivirajasingh S, Story MD, Legerski RJ.** (2004) Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol Cell Biol* **24**: 9207–9220
- Zhong Q, Boyer TG, Chen PL, Lee WH.** (2002) Deficient Nonhomologous End-Joining Activity in Cell-free Extracts from Brca1-null Fibroblasts. *Cancer Res* **62**: 3966–3970.

7. Dank

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Claudia Rube und Herrn Professor Dr. Christian Rube für die Bereitstellung des Themas und die hilfsreiche Betreuung bei der Durchführung der Experimente und der inhaltlichen Aufarbeitung

Herrn Dr. Martin Kühne danke ich herzlich für seine wertvolle Betreuung bei der Durchführung der Experimenten, die Datenverarbeitung und die inhaltliche Aufarbeitung dieser Arbeit.

Bei Herrn Egil H. Gleditsch möchte ich mich für die tolle Kooperation und Unterstützung bei der Durchführung der Experimenten herzlich bedanken.

Bei dem Personal des Labors für Strahlentherapie möchte ich für die unermüdliche technische Unterstützung bedanken

Für die Durchsicht und Aufarbeitung des Manuskripts möchte ich Frau Dr. Gudrun Haberl herzlich danken.

Schließlich, danke ich besonders meine Familie für ihre wertvolle Unterstützung, die sie mir alle diese Jahre haben zukommen lassen,

Lebenslauf

Persönliche Daten: Vorname: Efstathios
Familiename: Papadopoulos
Geburtsdatum: 08.07.1982
Geburtsort: Kalamata (Griechenland)
Nationalität: Griechisch
Adresse: Hohenzollernstraße 39, 66117 Saarbrücken
E-mail: pap.sth@googlemail.com

Schulbildung: Grundschule in 4. Nationalen Grundschule 1988-1994
Gymnasium in 3. Nationalen Gymnasium 1994-1997
Lyzeum in 3. Nationalen Lyzeum 1997-2000

Studium: Medizinstudium an dem medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes (WS 2001/2002 - SS 2008)

19.09.2003 Ärztliche Vorprüfung

29.05.2008 Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang 16.06.2008 Approbation als Arzt

Assistenzarzt der Augenklinik der Bundesknappschaft Sulzbach
Seit 09.2008