

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

**Untersuchungen zur individuellen
Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche
am Beispiel der Planungs-Computertomographie vor Radiotherapie
des Mammakarzinoms**

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

vorgelegt von: Matthias Strobel

geb. am: 19. August 1978 in Neunkirchen

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Prüfungsvorsitz:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Zusammenfassung.....	6
2. Summary.....	7
3. Einleitung.....	8
3.1. Grundlagen.....	9
3.2. DNA-Doppelstrangbrüche.....	9
3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	9
3.3.1. Nicht-homologe Endverknüpfung.....	10
3.3.2. Homologe Rekombination.....	10
3.4. Rolle von H2AX in der Reparatur von DNA-DSBs.....	12
3.5. Nachweismethoden von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	12
3.6. γ -H2AX als Biomarker.....	13
3.7. Individuelle Strahlenempfindlichkeit.....	13
3.8. Zielsetzung.....	14
4. Material und Methodik.....	15
4.1. Patientenkollektiv.....	15
4.2. Studienaufbau.....	15
4.3. Strahlenexposition.....	16
4.4. γ -H2AX-Methode.....	17
4.4.1. Blutentnahme.....	17
4.4.2. Lymphozytentrennung.....	17
4.4.3. Fixierung / Permeabilisierung.....	17
4.4.4. Färbung.....	18
4.5. Quantifizierung der γ -H2AX Foci.....	18
4.6. Dokumentation & Klassifikation der Strahlennebenwirkungen.....	19
4.7. Statistische Auswertung.....	20
5. Ergebnisse.....	21
5.1. Patientenkollektiv.....	21
5.2. Quantifizierung der γ -H2AX-Foci.....	22
5.3. <i>Ex vivo</i> -Reihe.....	23
5.4. <i>In vivo</i> -Reihe.....	27
5.5. Vergleichbarkeit von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Daten.....	29
5.6. Akute strahlenbedingte Hauttoxizität.....	29
6. Diskussion.....	31
6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	31
6.2. Methodik.....	31
6.2.1. γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
6.2.2. Verwendung peripherer Lymphozyten.....	33
6.2.3. Patientenkollektiv.....	33
6.3. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur.....	34
6.3.1. Validität / Bedeutung der Methode.....	34

6.3.2.	Abweichung der beobachteten Werte von der Poisson-Verteilung	35
6.3.3.	Vergleichbarkeit von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Daten.....	36
6.3.4.	Individuelle Strahlenempfindlichkeit.....	36
6.4.	Fazit und Ausblick	38
Literaturverzeichnis.....		39
Abbildungsverzeichnis		47
Tabellenverzeichnis		48
Danksagung.....		49
Lebenslauf.....		50

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 Binding Protein 1
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated-Kinase
ATR	ATM und Rad3-related-Kinase
BRCA 1	Breast cancer susceptibility gene 1
BRCA 2	Breast cancer susceptibility gene 2
CT	Computertomographie
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase (catalytic subunit)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Gy	Gray
HR	Homologe Rekombination
IgG	Immunglobulin G
MDC1	Mediator of DNA checkpoint protein 1
Mre 11	Meiotic recombination protein 11
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
Nbs1	Nijmegen Breakage Syndrome
NHEJ	Nicht homologes Endjoining
PBS	Phosphate buffered saline (salzhaltige Pufferlösung)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PIKK	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ähnliche Kinasen
rpm	rounds per minute
V(D)J	V - variable, D - diversifying, J - joining
XRCC4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 4

Darüber hinaus wurden die üblichen Einheiten des SI-Systems verwendet.

1. Zusammenfassung

Ziel: Untersuchung des Zusammenhangs von *in vivo* und *ex vivo* bestimmten DNA-Schäden nach computertomographischer Untersuchung des Thorax und dem Auftreten klinischer Strahlenschäden bei Patientinnen mit einseitig lokalisiertem Mammakarzinom nach Strahlentherapie, sowie Bestimmung der Korrelation beider Methoden.

Material und Methodik: Untersucht wurden 14 Patientinnen mit einseitig lokalisiertem Mammakarzinom, die sich einer Computertomographie des Thorax zur Planung der Strahlentherapie unterzogen. Die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) wurden mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie an Lymphozyten *in vivo* und *ex vivo* 0,5 h; 2,5 h und 5 h sowie *in vivo* zusätzlich 24h nach Strahlenexposition quantifiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit, wurde die Zahl der gemessenen DSBs nach CT auf das jeweilige Dosislängenprodukt normiert. Die *ex vivo* Proben wurden mit unterschiedlichen Dosierungen zwischen 10 und 500 mGy bestrahlt. Die akuten kutanen Strahlennebenwirkungen wurden während der Strahlentherapie wöchentlich nach dem modifizierten RTOG – Score dokumentiert.

Ergebnisse: Bei allen Patientinnen war eine mit fortschreitender Reparaturzeit deutliche Abnahme der Foci-Zahl gegenüber den vorherigen Werten zu erkennen ($0,12 \pm 0,06$ Foci/Zelle 0,5 h nach *ex vivo* Strahlenexposition von 10 mGy gegenüber $0,02 \pm 0,005$ Foci/Zelle 5 h nach Strahlenexposition mit 10 mGy). Die *in vivo* Daten entsprachen in etwa den Daten der *ex vivo* Bestrahlung mit 10 mGy. Dreißig Minuten nach Strahlenexposition (10 mGy) variierten die γ -H2AX- Foci von 0,03 Foci/Zelle bis 0,23 Foci/Zelle. In der *in vivo* Versuchsreihe zeigte sich eine ähnlich große Varianz (0,06 Foci/Zelle bis 0,23 Foci/Zelle). Patientinnen mit starken Hautnebenwirkungen zeigten keine gegenüber dem Mittelwert gesteigerten Focizahlen (t-Test_{*in vivo*}, $p=0,420$, t-Test_{*ex vivo*}, $p=0,610$). Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen *in vivo* und *ex vivo* Ergebnissen konnte nicht nachgewiesen werden (Spearman's $\rho_{10\text{mGy}/in\ vivo}$: $-0,02$, $p=0,478$).

Schlussfolgerung: Die *in vivo* und *ex vivo* DSB-Reparatur nach Bestrahlung kann mittels γ -H2AX-Messung verlässlich nachgewiesen werden. Weitere Studien sind notwendig, um die Diskrepanz zwischen *in vivo* und *ex vivo*-Messungen zu eruieren.

2. Summary

Purpose: To evaluate the impact of individual *in vivo* and *ex vivo* DNA double strand break (DSB) repair capacity after computed tomography examinations on the incidence of acute radiotoxicity in radiotherapy of breast cancer and to correlate the results of *in vivo* with *ex vivo* samples.

Material and Methods: 14 patients with unilateral breast cancer undergoing computed tomography before radiotherapy were examined. To assess DSB-repair, γ -H2AX-foci in blood lymphocytes were quantified before and 0,5 h; 2,5 h; 5 h and 24 h after *in vivo* radiation exposure. At the same time γ -H2AX-foci in blood lymphocytes collected before computed tomography were quantified 0,5 h; 2,5 h and 5 h after *ex vivo* exposure to different radiation doses between 10 and 500 mGy. A modified RTOG-Score was assessed weekly during radiotherapy to measure acute radiotoxicity, defined as skin reactions of the breast.

Results: Analysis of *in vivo* and *ex vivo* samples showed both time-dependent loss of γ -H2AX foci which reflects DNA-DSB repair after irradiation ($0,12 \pm 0,06$ foci/cell 0,5 h after *ex vivo* irradiation with 10 mGy vs. $0,02 \pm 0,005$ foci/cell 5 h after *ex vivo* irradiation with 10 mGy). Data of *in vivo* radiation (computed tomography) are almost equivalent to data of *ex vivo* exposure to 10 mGy. The amount of γ -H2AX-foci varied between 0,03 foci/cell and 0,23 foci/cell 0,5 h after *ex vivo* irradiation with 10 mGy. *In vivo* samples showed a minimum of 0,06 foci/cell to at most 0,23 foci/cell 0,5 h post exposure. Although differences in interindividual repair capacity occurred, no strong correlation between radiation side effects and patients' data was found (t-Test_{*in vivo*}, $p=0,420$, t-Test_{*ex vivo*}, $p=0,610$). No correlation between *in vivo* and *ex vivo* data was found (Spearman's $\rho_{10\text{mGy}/in vivo}$: $-0,02$, $p=0,478$).

Conclusion: *In vivo* and *ex vivo* DNA-DSBs repair capacity can be measured reliably by γ -H2AX-foci in blood lymphocytes. Further studies are needed to evaluate the discrepancy between *in vivo* and *ex vivo* measurements.

3. Einleitung

Ionisierende Strahlung kann eine Vielzahl von gesundheitsschädlichen Effekten im Menschen zur Folge haben. So verursacht eine Bestrahlung von zum Beispiel einem Gy etwa 1000-2000 Einzel- und 40 Doppelstrangbrüche pro Zelle (Connell und Hellman 2009). Als besonders gravierend gelten dabei DNA-Doppelstrangbrüche, die zu genetischer Instabilität führen und die Entstehung von Tumoren begünstigen. Ein großer Teil der natürlichen Strahlenbelastung (abgesehen von kosmischer und terrestrischer Strahlung) entfällt heutzutage auf medizinische Diagnostik (Röntgen, Computertomographie) und onkologische Therapie (Radiotherapie). Dabei beeinflussen sowohl extrinsische (Bestrahlungsdosis, Fraktionierung, bestrahltes Volumen) als auch intrinsische, genetisch determinierte Faktoren die individuelle Radiosensitivität. Tests, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung strahlenbedingter Nebenwirkungen zuverlässig vorhersagen, existieren bislang nicht. Die Analyse von Blutproben strahlenbehandelter Patienten auf das Vorhandensein verschiedener Genvarianten und die Etablierung von Gewebe-Datenbanken im Rahmen des Gene-Pare und des GENEPI Projekts der Europäischen Strahlentherapiegesellschaft ESTRO (Ho et al. 2006, Baumann et al. 2003) sollen zum besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen genetischen Risikofaktoren und radiotherapeutischen Effekten führen und damit Voraussetzungen zur Entwicklung prädikativer Tests schaffen. Genvarianten, die in Zusammenhang mit einer erhöhten Radiosensitivität gebracht werden, sind zum Beispiel Mutationen im ATM, NBS oder XRCC1- Gen (Fernet und Hall 2004).

Aufgrund der Bedeutsamkeit von DNA-DSBs für die genomische Integrität einer Zelle, werden auch DNA-Reparaturdefekte als Ursache erhöhter Strahlensensitivität diskutiert.

In dieser Studie wurden durch Computertomographie-induzierte DNA-DSBs mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Methode ermöglicht die Beurteilung der DNA-Reparaturkinetik *in vivo* und bildet damit eine potenzielle Grundlage für die Entwicklung eines prädiktiven Tests. Eine frühzeitige Identifikation von Risiko-Patienten könnte durch eine Anpassung der individuellen Therapie zur Reduktion von radiogenen Nebenwirkungen beitragen.

3.1. Grundlagen

3.2. DNA-Doppelstrangbrüche

DNA-DSBs stellen eine besonders schwerwiegende Art der DNA-Schädigung dar. Für die Zelle sind sie zwar potenziell reparabel, führen jedoch weitaus häufiger als andere strahleninduzierte Schäden zu Zelltod und/oder Verlust der genomischen Integrität (Khanna und Jackson 2001, Hoeijmakers 2001). Sie entstehen durch exogene Faktoren wie Chemikalien (Povirk et al. 1977) und Strahlung (Olive et al. 1990, Green et al. 1994), aber auch im Rahmen physiologischer Prozesse wie zum Beispiel der Replikation (Cox et al. 2000). In Zusammenhang mit der V(D)J-Rekombination in Lymphozyten erfüllt die spontane Entstehung von DNA-DSBs möglicherweise den Zweck, die genetische Diversität zu erhöhen (Kim et al. 2000, Lieber et al. 2004). Während Basenschäden oder Einzelstrangbrüche erst in sehr großer Anzahl letal für die Zelle sind (Ward et al. 1987), kann bereits ein einziger Doppelstrangbruch den Zelltod bedeuten, sofern er Gene trifft, die für die Überlebensfähigkeit der Zelle von essentieller Bedeutung sind (Olive 1998, Rich et al. 2000). Zum Schutz der genetischen Information haben eukaryontische Zellen ein hoch komplexes und stark konserviertes Netzwerk von Schadensmelde- und Reparatursystemen entwickelt (Rouse und Jackson 2002, Bassing und Alt 2004, Harrison und Haber 2006), die in ihrer Gesamtheit als DNA-Schadensantwort bezeichnet werden. Um eine effiziente Schadensbehebung zu gewährleisten, müssen Zellzyklus- und Reparaturvorgänge wirksam miteinander koordiniert werden. Das zentrale Schlüsselprotein der DNA-Schadensantwort ist die ATM-Kinase (*Ataxia teleangiectasia mutated*) (Uziel et al. 2003). Sie gehört wie auch die ATR (*ATM und Rad3-related protein*) und die DNA-PKcs (*DNA-abhängige Proteinkinase*) zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK) und wird von einem der wichtigsten DNA-Schadenssensorproteine, dem MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1), zur Schadensstelle rekrutiert (Paull und Lee 2005). In aktivem Zustand phosphoryliert sie eine Vielzahl von Substraten (Matsuoka et al. 2007), die an DNA-Reparaturmechanismen und Zellzykluskontrolle beteiligt sind.

3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zur Beseitigung der DSBs stehen eukaryontischen Zellen zwei Hauptreparatur-Mechanismen zur Verfügung, die nicht homologe Endverknüpfung (Nonhomologous Endjoining = NHEJ)

und die homologe Rekombination (Haber 2000, Lieber et al. 2003, Jackson 2002). Während die homologe Rekombination auf das Vorliegen homologer Sequenzen angewiesen ist und daher nur in der späten S- beziehungsweise G2-Phase des Zellzyklus auftritt (Johnson & Jasin 2001, Rothkamm et al. 2003), kann die nicht homologe Endverknüpfung während des gesamten Zellzyklus erfolgen und stellt grundsätzlich den bevorzugten Reparaturmechanismus in Eukaryonten dar (Löbrich und Jeggo 2005, Sonoda et al. 2006). Im Gegensatz zur homologen Rekombination kann jedoch keine fehlerfreie Wiederherstellung der Basenabfolge sichergestellt werden (Burma et al. 2006). Eine Übersicht der beiden Reparaturvorgänge ist **Abbildung 1** zu entnehmen.

3.3.1. Nicht-homologe Endverknüpfung

Bei der nicht-homologen Endverknüpfung kommt es zu einer direkten Verknüpfung freier DNA-Enden (Lieber et al. 2003). Das Schlüsselenzym der NHEJ ist die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die aus dem KU80/70-Heterodimer und der katalytischen Untereinheit des Enzyms besteht (Jeggo 1997, Smith und Jackson 2001). Da der DSB in den seltensten Fällen als „sauberer Schnitt“ vorliegt, müssen die Bruchenden zunächst nukleolytisch prozessiert werden (Paull und Gellert 1998). Das Ku-Protein bindet dann sequenzunabhängig und aktiviert dabei die katalytische Untereinheit der DNA-PK (Pang et al. 1997). Im nächsten Schritt kommt es zu einer Bindung des Ligase4/XRCC4 Komplexes (Leber et al. 1998), der eine Verbindung der Bruchenden ermöglicht (Li et al. 1995).

3.3.2. Homologe Rekombination

Voraussetzung für die homologe Rekombination ist das Vorliegen einer identischen DNA-Kopie, die während des Reparaturprozesses als Matrize für die Neusynthese des beschädigten Stranges dienen kann. Auf diese Art und Weise kommt es kaum zu Informationsverlust (Paques und Haber 1999).

In einem ersten Schritt wird der DSB von einem Sensorprotein wie dem MRN-Komplex erkannt (Paull & Gellert 1998) und eine nukleolytische Prozessierung der Bruchenden eingeleitet. Auf diese Weise entstehen einzelsträngige 3'-Überhänge, die vom Replikationsprotein A (RPA) stabilisiert werden. Die Rekombinase RAD 51 bindet über eine Vielzahl von Proteinen (BRCA 2/BRCA 1/RAD 52) an die einzelsträngige DNA und bildet das Nukleoproteinfilament, welches für das Auffinden homologer Sequenzen und die nachfolgen-

de Stranginvasion in das unbeschädigte Schwesterchromatid verantwortlich ist (Helleday 2007). Mit Hilfe der Polymerase I erfolgt die Wiederherstellung der Sequenzen im Bereich der Bruchstelle. Der entstandene Überkreuzungspunkt wird als Holliday-Junction bezeichnet (Holliday et al, 1964) und wandert an der DNA entlang (sog. Branch migration). Nach abgeschlossener DNA-Synthese werden die Holliday-Junctions durch Helikasen (BLM, WRN) und Nukleasen (Mus81/Eme 1) aufgelöst. Eventuell entstehende Lücken werden aufgefüllt und die DNA-Stränge mittels Ligase I miteinander verknüpft.

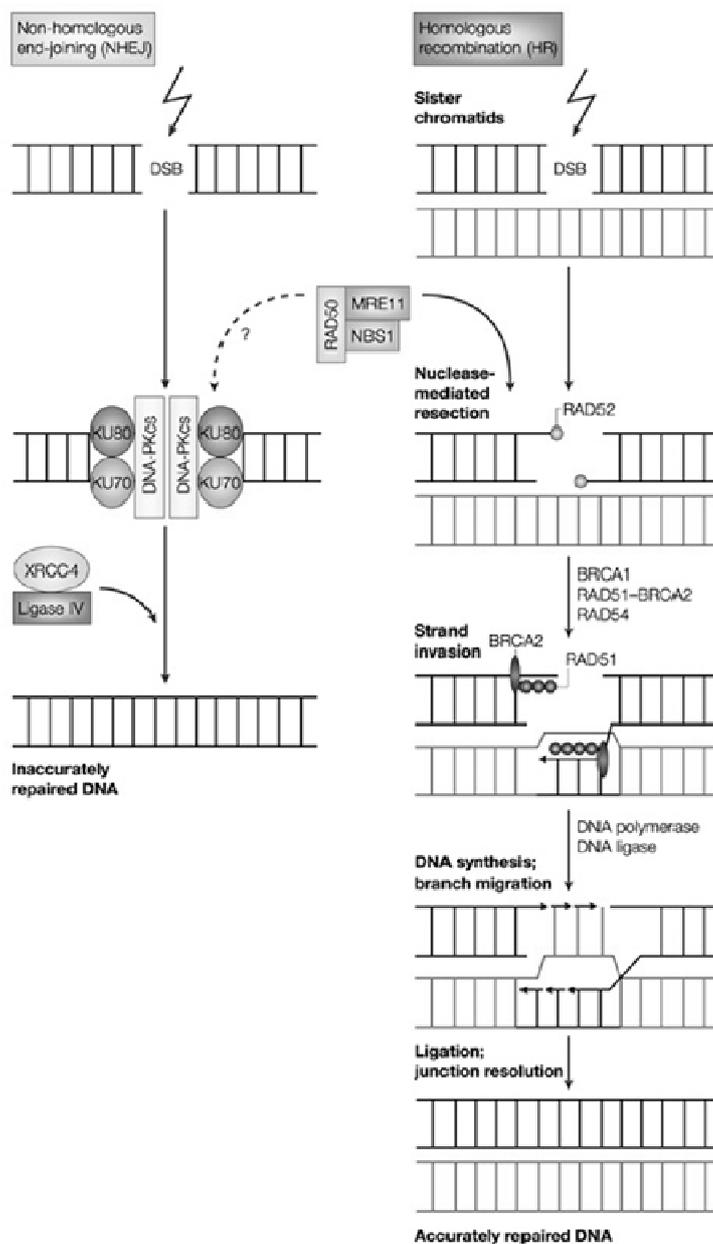


Abbildung 1. DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen (aus Shiloh 2003).

Schematische Darstellung der nicht homologen Endverknüpfung (links) und der homologen Rekombination (rechts).

3.4. Rolle von H2AX in der Reparatur von DNA-DSBs

Mittlerweile ist klar, dass auch die Modifikation der Chromatinstruktur eine wesentliche Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt (Bartek und Lukas 2007, Misteli und Sotouglou 2009).

Diese erfolgt über eine ATM/ATR/DNA-PK vermittelte Phosphorylierung des Serins 139 im Histon H2AX (Rogakou et al. 1998, Rogakou et al. 1999). Innerhalb kürzester Zeit nach Schädigung kommt es zu einer Akkumulation phosphorylierten H2AX (γ -H2AX) rund um die Bruchstellen (Paull et al. 2000, Pilch et al. 2003), die mit einer verstärkten Ansammlung weiterer Reparaturfaktoren (Paull et al. 2000, Yuan und Chen 2010) vergesellschaftet ist. Zu diesen Reparaturproteinen zählen zum Beispiel BRCA 1, Rad51, MRN-Komplex, p53BP1 und MDC1 (Paull et al. 2000, Goldberg et al. 2003, Kobayashi 2004, Bekker-Jensen et al. 2006). Die Interaktion von γ -H2AX mit dem Protein MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein1) führt zu einer verstärkten Rekrutierung von ATM und damit zu einer Phosphorylierung zusätzlicher, weiter entfernt liegender H2AX-Moleküle (Stucki et al. 2005, Stucki und Jackson 2006, Lou et al. 2006). Die Akkumulation von γ -H2AX führt zur Modifikation einer gesamten Chromatindomäne, die als epigenetisches Signal für einen DNA-Schaden gewertet werden kann und im Zellkern mikroskopisch als „Focus“ sichtbar wird (Rogakou et al. 1999).

3.5. Nachweismethoden von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese) zählt zu den etablierten methodischen Standards zum Nachweis von DNA- Doppelstrangbrüchen (Birren et al. 1988, Löbrich et al. 1993). Das Prinzip der PFGE beruht auf der Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Verlässliche Daten können allerdings erst ab einer Röntgendosis von 5 Gy bestimmt werden.

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen bietet die Visualisierung und Quantifizierung der γ -H2AX – Foci. Hierfür wurden Antikörper entwickelt, die gegen die phosphorylierte Form des Histons gerichtet sind (Rogakou et al. 1998). Nach Zugabe sekundärer fluoreszenzmarkierter Antikörper können die Foci mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) oder durch Auszählen der γ -H2AX – Foci unter dem Mikroskop quantifiziert werden. Auf diese Art und Weise lassen sich DNA-Doppelstrangbrüche bereits ab einer Strahlendosis von 1 mGy nachweisen (Rothkamm und Löbrich 2003, Kinner et al. 2008).

3.6. γ -H2AX als Biomarker

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der γ -H2AX Foci mit der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in der Zelle korreliert (Rothkamm und Löbrich 2003, Löbrich et al. 2005, Kuo und Yang 2008) und dass das Verschwinden eines Focus die Dephosphorylierung von γ -H2AX im Rahmen von Reparaturvorgängen widerspiegelt (Löbrich et al. 2005, Kinner et al. 2008). Aufgrund dieser Tatsache eignet sich γ -H2AX als sensitiver und spezifischer Marker für DNA-DSB und erlaubt Aussagen zur individuellen Reparaturkinetik in vivo zu treffen. Daraus ergeben sich mehrere Einsatzmöglichkeiten: ein gezieltes Monitoring zytotoxischer Effekte von Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie, sowie die Vorhersagemöglichkeit individueller Strahlenempfindlichkeit des zu bestrahlenden Tumors beziehungsweise des umliegenden Normalgewebes (Olive und Banath 2004).

3.7. Individuelle Strahlenempfindlichkeit

Die Normalgewebetoxizität nach Strahleneinwirkung unterliegt starken interindividuellen Schwankungen (Bentzen und Overgaard 1994) und ist nach heutigem Kenntnisstand multifaktorieller Genese. Neben einer individuell unterschiedlich starken Aktivierung von Chemokinen und Zytokinen (Rübe et al. 2005, Bentzen et al. 2006) werden auch genetisch determinierte DNA-Reparaturdefekte als mögliche Erklärung herangezogen. So zeigen zum Beispiel Patienten mit dem Krankheitsbild Ataxia teleangiectasia, welches durch eine Mutation im ATM-Gen verursacht wird, neben neurologischen und dermatologischen Auffälligkeiten auch eine ausgesprochen hohe Sensitivität gegenüber Strahlung und Radiomimetika (McKinnon 2004). Auch für heterozygote Mutationsträger konnte ein erhöhtes Risiko für schwere Normalgewebsreaktionen nach therapeutischer Bestrahlung der Brust aufgezeigt werden (Chargari et al. 2009, Fang et al. 2010).

Ähnliches gilt für das Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), das durch einen Defekt des Nbs1-Gens hervorgerufen wird, und für Patienten mit Ligase-4-Mangel. Zellen dieser Patienten weisen im Vergleich zu Zellen von gesunden Patienten eine wesentlich höhere Radiosensitivität und ein erhöhtes Maß an chromosomaler Instabilität auf (Taalman et al. 1983, O'Driscoll et al. 2001, O'Driscoll et al. 2004).

3.8. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des γ -H2AX-Assays DNA-Schäden und Reparaturkinetiken nach erfolgter Computertomographie bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu bestimmen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine klinisch unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit auf molekularer Ebene nachvollzogen werden kann. Gerade im Niedrigdosisbereich liegen derzeit wenige Daten hinsichtlich einer Korrelation zwischen DNA-DSB-Reparatur und individueller Strahlenempfindlichkeit vor. Untersucht wurden a) der Zusammenhang zwischen *in vivo*- als auch *ex vivo*-Proben mit der Radiotoxizität unabhängig voneinander, sowie b) eine mögliche Korrelation zwischen beiden Methoden im Hinblick auf die Toxizität. Im Falle einer positiven Korrelation würde sich die Möglichkeit der *ex vivo*-Bestrahlung einer Blutprobe vor therapeutischer Radiatio eröffnen, Patientinnen mit einem DNA-Reparaturdefekt und einer damit verbundenen erhöhten Strahlenempfindlichkeit zu detektieren. Eine bessere Vorhersage der Behandlungsverträglichkeit wäre bedeutsam für das Therapiemonitoring und die jeweilige Supportivtherapie.

4. Material und Methodik

4.1. Patientenkollektiv

Die Studie wurde nach Kriterien der Deklaration von Helsinki und unter Zustimmung der verantwortlichen Ethikbehörde (Ärztchamber des Saarlandes) durchgeführt.

Untersucht wurden Patientinnen im Alter von 18-80 Jahren, bei denen erstmalig ein einseitig lokalisiertes Mammakarzinom diagnostiziert worden war und die sich nach brusterhaltender Therapie zur Planung der adjuvanten Strahlentherapie einer computertomographischen Untersuchung unterzogen. Alle Patientinnen haben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gegeben. Als Ausschlusskriterium wurde eine vorbestehende Tumorerkrankung mit Vorbestrahlung definiert.

4.2. Studienaufbau

Zur Beurteilung der individuellen Reparaturkinetik wurden DSBs mittels γ -H2AX Immunfluoreszenzmikroskopie in Lymphozyten untersucht, die aus dem heparinisiertem Vollblut der Patientinnen gewonnen wurden. Zum Vergleich der Reparaturkinetik *in vivo* und *ex vivo* war ein doppelter Versuchsaufbau notwendig. Aus diesem Grund wurde den Testpersonen vor der computertomographischen Untersuchung genügend Blut für die *ex vivo*-Reihe entnommen. Nach Zusatz von Nährmedium wurden die Proben im Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes in einer Röntgenröhre mit jeweils 10, 20, 40, 100 und 500 mGy bestrahlt. Um die Anzahl der bereits vor der Strahlenexposition vorhandenen DNA-DSBs zu erkennen, wurde zu jedem Untersuchungspunkt eine nicht bestrahlte Probe als Kontrolle mit untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Proben der *ex vivo*-Reihe zeitgleich zu der computertomographischen Untersuchung der jeweiligen Patientin bestrahlt. Untersuchungszeitpunkte waren 0,5 h; 2,5 h und 5 h nach Strahlenexposition. Das Blut für die *in vivo*-Reihe wurde den Patientinnen jeweils zu den oben genannten Zeitpunkten entnommen, mit Nährmedium angereichert und direkt untersucht. Zusätzlich wurde eine weitere *in vivo*-Probe 24 h nach Strahlenexposition kontrolliert (siehe **Tabelle 1**).

Versuchsreihe	Blutentnahme [BE]	Strahlendosis [mGy]	Reparaturzeit [h]			
			0,5	2,5	5	24
Ex vivo	3ml vor CT	10	x	x	x	*
	3ml vor CT	20	x	x	x	*
	3ml vor CT	40	x	x	x	*
	3ml vor CT	100	x	x	x	*
	3ml vor CT	500	x	x	x	*
In vivo	3 ml entsprechend den Untersuchungszeitpunkten	CT (range DLP: 239 – 500 mGy·cm)	x	x	x	x

Tabelle 1. Versuchsaufbau

* Die *ex vivo* Proben waren 24 h nach Bestrahlung aufgrund stattgehabter Hämolyse nicht auszuwerten.
DLP = Dosislängenprodukt

4.3. Strahlenexposition

Die Computertomographie des Thorax erfolgte unter Verwendung eines zweizeiligen Computertomographen (Elscent Twin Flash CT, Philips Medical Systems, Eindhoven, Niederlande) mit folgenden Bestrahlungsparametern: 70-250 mA·s, 120kV, 0,5-0,75 Rotationszeit, 1-5 mm kollimierter Schichtdicke, 0,5-1,25 Pitch (Tischvorschub pro Rotation/Gesamtbreite des kollimierten Strahls). Anhand dieser Parameter konnten volumetrische CT-Dosisindexes ($CTDI_{vol}$) berechnet werden. Da in Abhängigkeit von der Größe des bestrahlten Volumens auch ein unterschiedlich großes Blutvolumen bestrahlt wurde, wurde für jede Patientin ein Dosislängenprodukt berechnet. Die Dosislängenprodukte (Produkt aus $CTDI_{vol}$ und Scanlänge) variierten von 239 bis 500 mGy·cm.

Für die *ex vivo* Bestrahlung wurde eine Röntgenröhre mit einer Anode verwendet. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Spannung von 90 kV, einer Stromstärke von 6mA und einer Dosisleistung von 10 - 500 mGy. Zwischen Probe und Anode wurde die Strahlung durch eine 1 mm dicke Aluminium- und 2 mm dicke Plastikplatte gefiltert. Die Dosisleistungen wurden mit einem Weichstrahlkammerdosimeter (PTW-SN4 dosimeter, type 761; Freiburg, Germany) bestimmt. Die mit Kulturmedium versetzten Blutproben wurden bei Raumtemperatur in Falconröhrchen bestrahlt.

4.4. γ -H2AX-Methode

4.4.1. Blutentnahme

Den Patientinnen wurde aus einer Kubitalvene Blut entnommen. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurden heparinisierte Monovetten verwendet. Jeweils 3 ml Vollblut wurden mit 6 ml Nährmedium (RPMI 1640 + 10% FCS [fetales Kälberserum] + 1% Penicillin/Streptomycin) versetzt.

4.4.2. Lymphozytentrennung

Die Trennung der Lymphozyten erfolgte anhand der Empfehlungen des Herstellers (PAA-Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland).

Dabei wurde das verdünnte Vollblut auf das Lymphozyten-Trennmedium Percoll 400 (LSM 1077, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), ein hydrophiles Polymer mit einem molekularen Gewicht von 400.000 Dalton, aufgetragen. Durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 1200 g und Raumtemperatur (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) sammelten sich die Lymphozyten entsprechend ihres Dichtegradienten ringförmig in der Interphase. Flow-Zytometrie-Analysen konnten zeigen, dass die Interphase zu 80% aus Lymphozyten (60% CD4, 15% CD8, 5% CD 19, 15% Monozyten und 5% Granulozyten) besteht (Löbrich et al. 2005). Die mit RPMI 1640 vermengten Blutproben der *ex vivo*-Reihe, welche zu einem späteren Zeitpunkt untersucht wurden, wurden bei 37°C und 5% Kohlendioxid in einem Wärmeschrank gelagert.

4.4.3. Fixierung / Permeabilisierung

Die abpipettierte Lymphozytenphase wurde nach zweimaligem Waschen in der Pufferlösung PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH: 7,4) auf Deckgläser aufgetragen und in Methanol bei -20°C dreißig Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei -20°C für eine Minute in Aceton permeabilisiert.

4.4.4. Färbung

Nach zweimaligem, je zehnminütigem Waschen in PBS/NS auf dem Wippeltisch (PBS/Ziegen-Normalserum 1:100; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), wurden die Proben für 30 Minuten mit PBS/NS geblockt, um so unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss wurde der Primärantikörper (Anti-phospho-Histone H₂AX [Ser139], clone JBW30, mouse monoclonal IgG1; Upstate, Temecula, CA, USA) in einem Verhältnis von 1:800 mit PBS/NS verdünnt, gevortext und für 60 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte mit jeweils 40 µl/Deckglas über 12h in einer feuchten Kammer bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben dreimal in PBS/NS gewaschen, bevor dann der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:400 (Alexa Fluor 488, goat-anti-mouse IgG; Invitrogen molecular probes, Oregon, US) zu jeweils 80 µl aufpipettiert wurde. Alexa Fluor 488 absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 495 nm und emittiert es mit einer Wellenlänge von 519 nm. Nach einstündiger Inkubationszeit im Dunkeln, wurden die Deckgläser drei weitere Male für jeweils 10 Minuten in PBS/NS gewaschen. Zum Schluss wurden die Proben mit DAPI-haltigem (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) Einschlussmittel (H-1500, Vectashield® Hard Set Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) auf Objektträger (HistoBond® -Objektträger; Marienfeld Laboratory; Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgelegt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung der DNA und damit indirekt zur Darstellung von Zellkernen dient. Diese Färbung ermöglicht eine bessere Zellzuordnung der γ -H2AX- Foci. Nach 24h wurden die Deckgläser mit klarsichtigem Lack versiegelt. Soweit nicht explizit angegeben, erfolgten alle Färbeschritte bei Raumtemperatur.

4.5. Quantifizierung der γ -H2AX Foci

Zur Auswertung der γ -H2AX- Foci wurden die Objektträger unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600) mit DAPI-Filter (4', 6-Diamidino-2-phenylindol: EX¹ 340-380, DM² 400, BA³ 435-495) und FITC-Filter (Fluorescein-5-isothiocyanat: EX 465-485, DM 505, BA 600-660) analysiert. Bei einer 100fachen Vergrößerung wurden pro Objektträger mindestens 100 Zellen und mindestens 40 Foci ausgewertet.

¹ EX = Anregungsfilter

² DM = Beamsplitter

³ BA = Emissionsfilter

Zur Verdeutlichung der Methode sind in **Abbildung 2** exemplarisch γ -H2AX- Foci nach Strahleneinwirkung dargestellt.

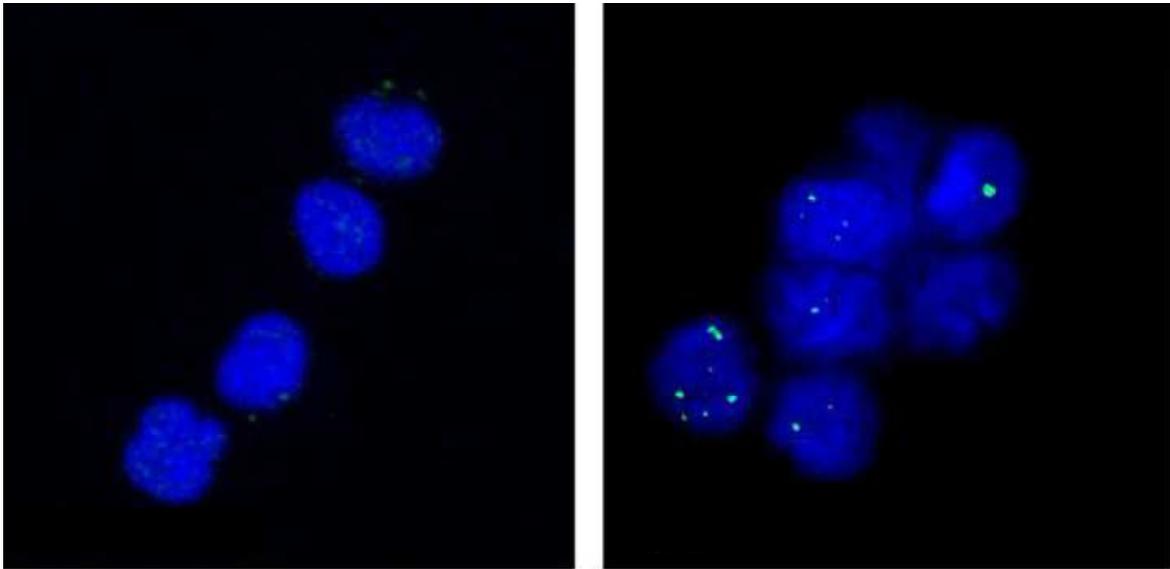


Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von γ -H2AX-Foci in Lymphozyten. Kontrollprobe (links), 30 Minuten nach Strahlenexposition (rechts). Die Zellkerne erscheinen blau; die grünen Punkte stellen die γ -H2AX Foci innerhalb der Zellkerne dar und entsprechen DNA-Doppelstrangbrüchen.

4.6. Dokumentation & Klassifikation der Strahlennebenwirkungen

Bei in der Regel guter Verträglichkeit der postoperativen Strahlentherapie der Mamma stehen Hautreaktionen im Vordergrund der akuten Nebenwirkungen. Die klinische Untersuchung auf akuttoxische Strahlennebenwirkungen wurde während der Strahlentherapie unter Verwendung eines modifizierten RTOG⁴-Scores wöchentlich durchgeführt. Die Modifikation erlaubte eine bessere Differenzierung im unteren Punktebereich des Scores.

Dabei wurden fünf Aspekte an jeweils drei verschiedenen mammären Lokalisationen der Haut (oberer äußerer, oberer innerer und mittlerer Quadrant) separat voneinander mit einer Punktzahl von 0 bis 3 Punkten bewertet (siehe **Tabelle 2**).

Erythem, Desquamation und Effloreszenzen wurden inspektorisch und eine Elevation der Hauttemperatur palpatorisch im Vergleich zur kontralateralen Brust begutachtet, während vorhandener Juckreiz erfragt wurde. Aus der Bewertung der fünf verschiedenen Hauterscheinungen wurde für jede der drei untersuchten Lokalisationen ein Summenscore gebildet. Der Gesamtscore ergab sich durch Addition der drei Punktsommen.

⁴ RTOG = Radiation Therapy Oncology Group

Hauterscheinung	Grad			
	0	1	2	3
Erythem	-	Geringfügig	Mäßig	Stark
Hauttemperaturanstieg*	-	Geringfügig	Mäßig	Stark
Desquamation	-	Trocken-schuppige Haut	Trockene Desquamation	Feuchte Desquamation
Juckreiz	-	Geringfügig	Mäßig	Stark
Effloreszenzen	-	Sporadisch	Vereinzelt	Konfluierend

Gesamtscore :

Tabelle 2. Modifizierter RTOG - Score für akute Strahlennebenwirkungen an der Brusthaut (siehe Röper et al. 2004).

Gesamtscore = Summe aller Punktskizzen für drei Lokalisationen (oberer äußerer, oberer innerer und mittlerer Quadrant). * = im Vergleich zur kontralateralen Brust.

4.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Excel 2003 und SPSS 14.0. Um zu gewährleisten, dass nur strahleninduzierte DNA-DSBs in der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, wurde von allen Proben die Foci-Zahl der entsprechenden Kontrollprobe abgezogen. Die Daten wurden unter Angabe des Mittelwerts und der Standardabweichung graphisch dargestellt.

Die ermittelte Häufigkeit von γ -H2AX-Foci pro Zelle wurde mittels Chi-Quadrat-Test auf eine Poissonverteilung getestet.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der γ -H2AX-Foci und strahlenbedingten Nebenwirkungen wurde sowohl für die *in vivo*, als auch *ex vivo* Proben mittels t-Test untersucht.

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der *in vivo* und *ex vivo* Daten wurden für alle Versuchsreihen Reparaturquotienten aus den Daten 5h sowie 0,5h nach Strahlenexposition gebildet. Diese wurden mittels Spearman's Rangkorrelation miteinander verglichen. Eine statistische Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p < 0,05$) wurde als Signifikanzniveau festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 14 Patientinnen, von denen die jüngste zum Zeitpunkt der Untersuchung 39 Jahre und die älteste 78 Jahre alt war. Alle Frauen wiesen zum Zeitpunkt der strahlentherapeutischen Erstuntersuchung einen Karnofsky-Index von mindestens 80% auf. Neun von vierzehn Patientinnen hatten den Tumor in der linken Brust lokalisiert, 5 auf der rechten Seite. Bei sieben Frauen bestand eine Tumorausbreitung im Stadium pT1a-c, bei 5 Frauen im Stadium pT2, bei einer Patientin war die Ausbreitung des Tumors nicht sicher beurteilbar (TX). Die Tumorklassifikation beruhte auf der 6. Auflage des TNM-Systems. Bei vier Patientinnen waren axilläre Lymphknotenmetastasen vorhanden, alle Patientinnen waren frei von Fernmetastasen. Zehn Frauen erhielten eine adjuvante Chemotherapie, die in fünf Fällen von einer antihormonellen Therapie begleitet wurde (siehe **Tabelle 3**).

Patientencharakteristik	Alle (n = 14)	Adjuvante Chemotherapie (n = 10)	Antihormonelle Therapie (n = 9)
Alter (Jahre)			
Mittelwert	56	54	57
Standardabweichung	12	11	12
Spannbreite	(39-78)	(39-71)	(39-78)
Tumorlokalisation — n (%)			
Linke Brust	9 (64)	6 (60)	6 (67)
Rechte Brust	5 (36)	4 (40)	3 (33)
Tumorstadium — n (%)			
pTx	1 (7)	1 (10)	0 (0)
pT1a	1 (7)	0 (0)	1 (11)
pT1b	2 (14)	1 (10)	2 (22)
pT1c	4 (29)	4 (40)	3 (33)
pT2	5 (36)	4 (40)	3 (33)
Lymphknotenstatus — n (%)			
pN0	10 (71)	6 (60)	6 (67)
pN1a	4 (29)	4 (40)	3 (33)
Karnofsky Index — n (%)			
80	3 (22)	2 (20)	3 (33)
90	9 (64)	7 (70)	4 (44)
100	1 (7)	1 (10)	1 (11)
Bestrahlungsdosis — n (%)			
50 Gy/2 Gy ohne Boost	1 (7)	0 (0)	1 (11)
50 Gy/2 Gy + 10 Gy	12 (86)	9 (90)	8 (89)
50 Gy/2 Gy + 16 Gy/2Gy	1 (7)	1 (10)	0 (0)

Tabelle 3. Demographische und klinische Parameter des untersuchten Patientenkollektivs.

5.2. Quantifizierung der γ -H2AX-Foci

Im Falle einer gleichmäßigen Bestrahlung des gesamten Blutvolumens entspräche die Verteilung der DSBs innerhalb der Lymphozyten einer Poissonverteilung (Savage JR 1970, Edwards et al. 1979). Die Poissonverteilung ist eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, die Voraussagen über die Anzahl des Eintretens seltener, zufälliger und voneinander unabhängiger Ereignisse in einem bestimmten Zeitintervall ermöglicht, wenn bereits zuvor bekannt ist, wie oft sie durchschnittlich erwartet werden.

In **Abbildung 3** ist die Anzahl der zum Zeitpunkt 0,5 h nach Strahlenexposition *in vivo* durch Computertomographie beobachteten Foci/Zelle sowie die statistisch zu erwartende Häufigkeit (Poissonverteilung) graphisch dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Daten aller Patientinnen gepoolt.

In der Mehrzahl der untersuchten Zellen (200 von 238 Zellen) wurden keine γ -H2AX-Foci gefunden, bei etwa 12% der untersuchten Zellen kam 1 γ -H2AX-Focus zur Darstellung. Die beobachteten Häufigkeiten unterschieden sich insgesamt nur in sehr geringem Ausmaß und nicht signifikant von den theoretisch ermittelten Häufigkeiten einer Poissonverteilung ($p = 0,220$, χ^2 -Test).

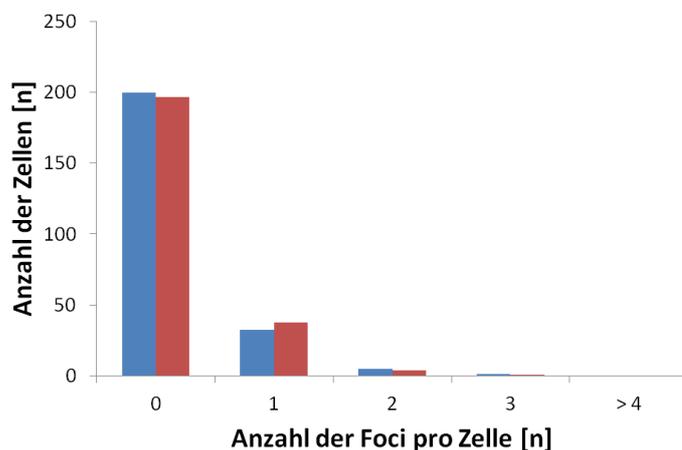


Abbildung 3. Beobachtete Häufigkeit (blau) und zu erwartende Häufigkeit nach Poisson (rot) von γ -H2AX-Foci 0,5 h nach Strahlenexposition durch Computertomographie (*in vivo*).

In **Abbildung 4** ist nun die Anzahl der zum Zeitpunkt 0,5 h nach *ex vivo* Strahlenexposition mit 10 mGy beobachteten Foci/ Zelle sowie die statistisch zu erwartende Häufigkeit

(Poissonverteilung) graphisch dargestellt. Auch hier waren in der Mehrzahl der untersuchten Zellen keine γ -H2AX-Foci nachzuweisen (261 von 304 Zellen). Darüber hinaus ist festzustellen, dass die beobachteten Häufigkeiten nahezu exakt den statistisch ermittelten und somit einer Poissonverteilung entsprechen ($p = 0,213$, χ^2 -Test).

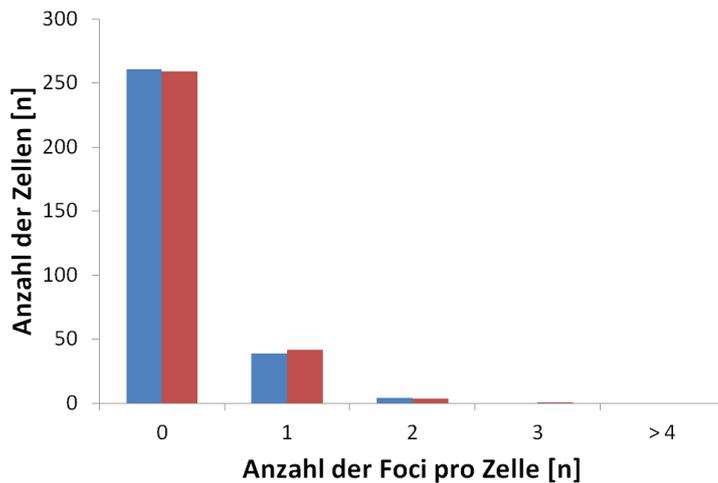


Abbildung 4. Beobachtete Häufigkeit (blau) und zu erwartende Häufigkeit nach Poisson (rot) von γ -H2AX-Foci 0,5 h nach Strahlenexposition mit 10 mGy (ex vivo)

5.3. Ex vivo-Reihe

Für die *ex vivo* Versuchsreihe wurde den Patientinnen vor der computertomographischen Untersuchung Blut abgenommen und mit unterschiedlich hohen Dosen bestrahlt (10, 20, 40, 100, 500 mGy). Die Anzahl der γ -H2AX Foci wurde dann nach 0,5 h; 2,5 h und 5 h nach Strahlenexposition in den Lymphozyten der Patienten untersucht.

In **Abbildung 5** ist die Anzahl der γ -H2AX Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Strahlendosis (10, 20, 40, 100, 500 mGy) dreißig Minuten nach Strahlenexposition dargestellt. Hierfür wurden Mittelwerte aus den entsprechenden Daten aller Patientinnen berechnet. Von diesen Mittelwerten wurden die Mittelwerte der unbestrahlten Kontrollen abgezogen (Hintergrund), um nur die durch Strahlung induzierten DSBs auszuwerten. Dabei wird deutlich, dass die Anzahl der γ -H2AX Foci linear zur Höhe der Strahlendosis steigt und damit die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche dosisabhängig induziert wird. So liegen die Mittelwerte 30 Minu-

ten nach Strahlenexposition bei $0,119 \pm 0,061$ Foci/Zelle für eine Strahlendosis von 10 mGy und bei $3,090 \pm 0,344$ Foci/Zelle für eine Strahlendosis von 500 mGy.

In **Abbildung 6** ist das Verschwinden der γ -H2AX Foci pro Zelle als Ausdruck der DNA-DSB Reparatur in Abhängigkeit von der Zeit (0,5h, 2,5h, 5h) exemplarisch für die Strahlendosen 10 und 100mGy der *ex vivo* Reihe sowie für die *in vivo* Proben nach computertomographischer Bestrahlung dargestellt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um korrigierte Mittelwerte aller Patientinnen (s.o.). Für alle applizierten Strahlendosen nimmt die Anzahl der Foci mit fortschreitender Zeit kontinuierlich ab. So liegen die Mittelwerte 30 Minuten nach Strahlenexposition bei $1,13 \pm 0,31$ Foci/Zelle für eine Strahlendosis von 100 mGy und bei $0,12 \pm 0,06$ Foci/Zelle für eine Strahlendosis von 10 mGy, während sie nach fünf Stunden nur noch bei $0,19 \pm 0,02$ Foci/ Zelle beziehungsweise $0,02 \pm 0,005$ Foci/Zelle liegen. Die *in vivo* Daten nach computertomographischer Untersuchung entsprechen in etwa den Daten der *ex vivo* Bestrahlung mit 10 mGy. Eine graphisch auffallende Differenz ist lediglich für den 5h-Wert zu erkennen (10mGy: $0,022 \pm 0,005$ Foci/Zelle; CT: $0,031 \pm 0,005$ Foci/Zelle).

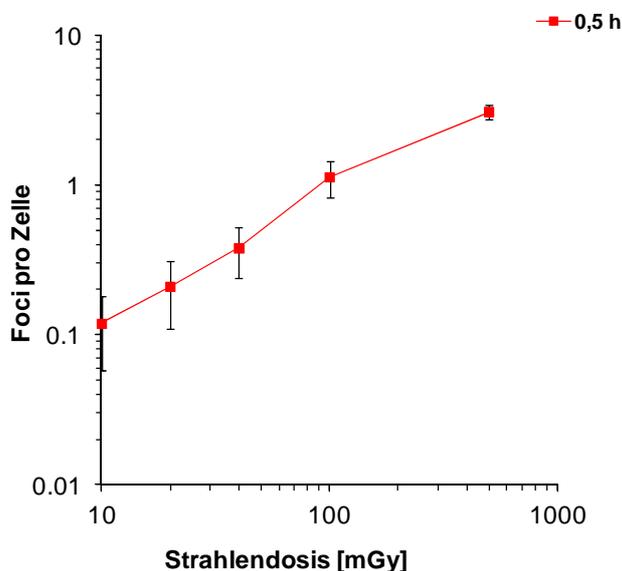


Abbildung 5. Dosisabhängige Foci-Induktion 0,5h nach Strahlenexposition.

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um korrigierte (nach Abzug des Hintergrunds) Mittelwerte \pm Standardabweichung.

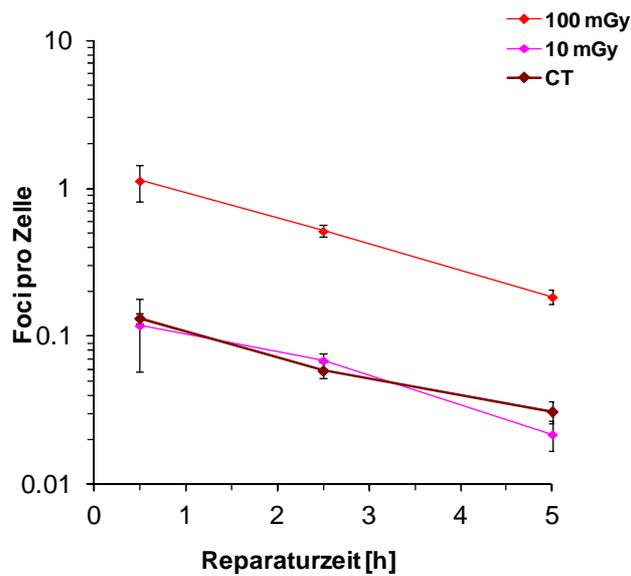


Abbildung 6. DNA-DSB Reparaturverlauf für unterschiedliche Bestrahlungsdosen.

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um korrigierte (nach Abzug des Hintergrunds) Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Abbildung 7 und **Abbildung 8** zeigen die individuellen Ergebnisse und Mittelwerte der *ex vivo* Proben in Abhängigkeit von der Zeit (0,5; 2,5 und 5h). Exemplarisch sind die Ergebnisse nach 10 und 100 mGy Strahlenexposition dargestellt. Der Hintergrund, das heißt die Anzahl der in Kontrollen messbaren Foci, wurde von den einzelnen Werten abgezogen. Dabei ist bei allen Patienten mit zunehmender Reparaturzeit ein deutlicher Foci-Verlust zu erkennen, was gleichbedeutend mit einer steigenden Anzahl an reparierten DNA-DSBs ist.

Dreißig Minuten nach Strahlenexposition von 10 mGy (**Abbildung 7**) zeigen sich interindividuelle Unterschiede von 0,03 Foci/Zelle (RR07) als kleinstem Wert bis 0,23 Foci/Zelle (AM14) als größtem Wert (Mittelwert $0,12 \pm 0,017$ Foci/Zelle). Im Verlauf relativieren sich diese Unterschiede aber wieder (Mittelwert nach 2,5 h: $0,06 \pm 0,01$ Foci/Zelle; Mittelwert nach 5h: $0,01 \pm 0,007$ Foci/Zelle).

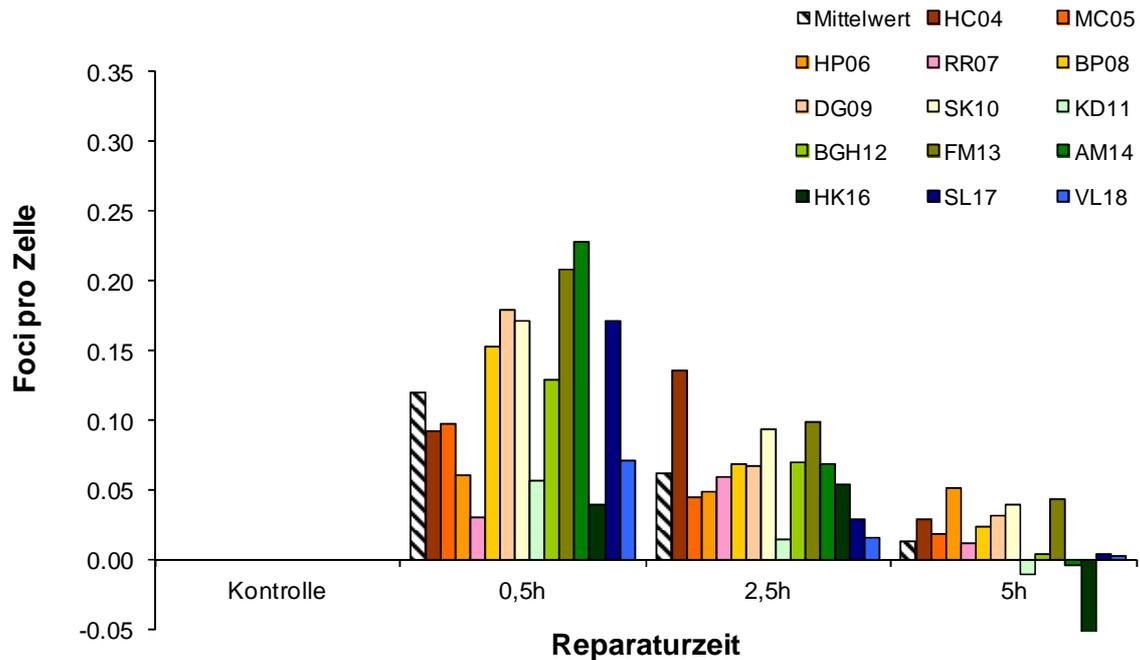


Abbildung 7. DNA-Doppelstrangbruchreparatur *ex vivo* nach einer Bestrahlung mit 10mGy.

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um die Ergebnisse der *ex vivo* Proben aller 14 Patientinnen 0,5, 2,5 und 5h nach einer Bestrahlung mit 10 mGy. Unspezifischer Hintergrund (messbare Foci in Kontrollproben) wurde von den Daten abgezogen. Für jeden Zeitpunkt ist ein Mittelwert mit abgebildet.

Weniger große interindividuelle Unterschiede finden sich dreißig Minuten nach einer Bestrahlung von 100 mGy (siehe **Abbildung 8**). Besonders stark weicht lediglich Patientin MC05 (1,930 Foci/Zelle) vom Mittelwert ab ($1,098 \pm 0,075$ Foci/Zelle). Ansonsten scheint der Foci-Verlust mit einer insgesamt vergleichbaren Kinetik bei allen Patientinnen voranzuschreiten.

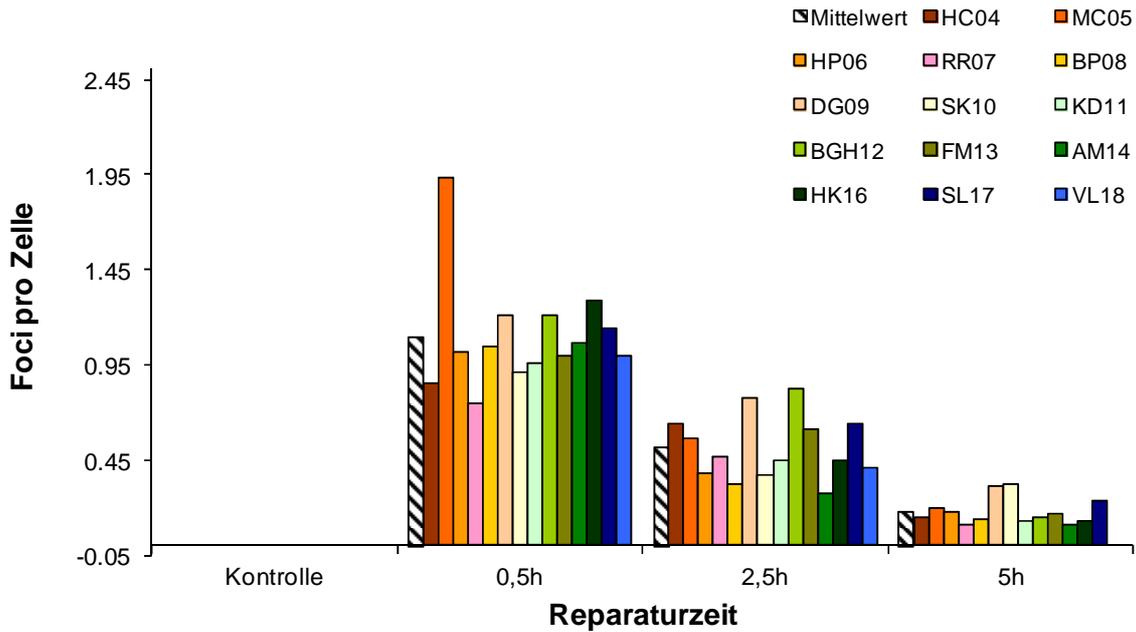


Abbildung 8. DNA-Doppelstrangbruchreparatur *ex vivo* nach einer Bestrahlung mit 100mGy.

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um die Ergebnisse der *ex vivo* Proben aller 14 Patientinnen 0,5, 2,5 und 5h nach einer Bestrahlung mit 100 mGy. Unspezifischer Hintergrund (messbare Foci in Kontrollproben) wurde von den Daten abgezogen. Für jeden Zeitpunkt ist ein Mittelwert mit abgebildet.

5.4. In vivo-Reihe

Für die *in vivo*-Versuche wurde den Patientinnen 0,5h, 2,5h, 5h und 24 h nach computertomographischer Bestrahlung eine Blutprobe entnommen und mittels γ -H2AX Immunfluoreszenzmikroskopie direkt untersucht.

In **Abbildung 9** sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe graphisch zusammengefasst. Da das computertomographische Bestrahlungsvolumen von Patientin zu Patientin variierte, wurden die Daten im Sinne besserer Vergleichbarkeit auf ein Dosislängenprodukt von 300 mGy·cm normiert. Der Mittelwert des Dosislängenprodukts betrug 269 mGy·cm mit einer Standardabweichung von 26,96 mGy·cm.

In der Abbildung sind für jeden Zeitpunkt der Messung die individuellen Patientendaten und eine mittlere Focizahl aufgeführt. Der Hintergrund, das heißt die Anzahl der in Kontrollen messbaren Foci, wurde von den einzelnen Werten abgezogen.

Bei allen Patienten ist eine mit fortschreitender Reparaturzeit deutliche Abnahme der Foci-Zahl gegenüber den vorherigen Werten zu erkennen. Diese Abnahme spiegelt eine Erholung

der Zelle nach Strahlenexposition wider, jedoch sind selbst nach einer Reparaturzeit von 24 h immer noch strahleninduzierte DNA-DSBs in den Zellkernen nachweisbar.

Der Foci-Verlust erscheint interindividuell vergleichbar, nennenswerte Ausreißer bilden auf den ersten Blick lediglich die Patientinnen BP08 und SL17 mit 0,21 und 0,23 Foci/Zelle nach 0,5 Stunden (Mittelwert: $0,16 \pm 0,01$), was sich im Verlauf jedoch relativiert. Nach 24 Stunden ist dieser Unterschied für BP08 verschwunden ($0,01$ Foci/Zelle gegenüber dem Mittelwert von $0,01 \pm 0,0$ Foci/Zelle). Die Patientin SL17 sticht nach 24h mit 0,046 Foci/Zelle immer noch heraus, zeigt aber nach 2,5 und 5 h keine besonderen Auffälligkeiten. Insgesamt muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um sehr kleine Zahlenwerte handelt und die interindividuellen Differenzen nicht besonders groß sind; der kleinste Wert nach 0,5 h liegt beispielsweise bei 0,06 Foci/Zelle (VL18) vs. 0,232 Foci/Zelle (SL17) als größtem Wert.

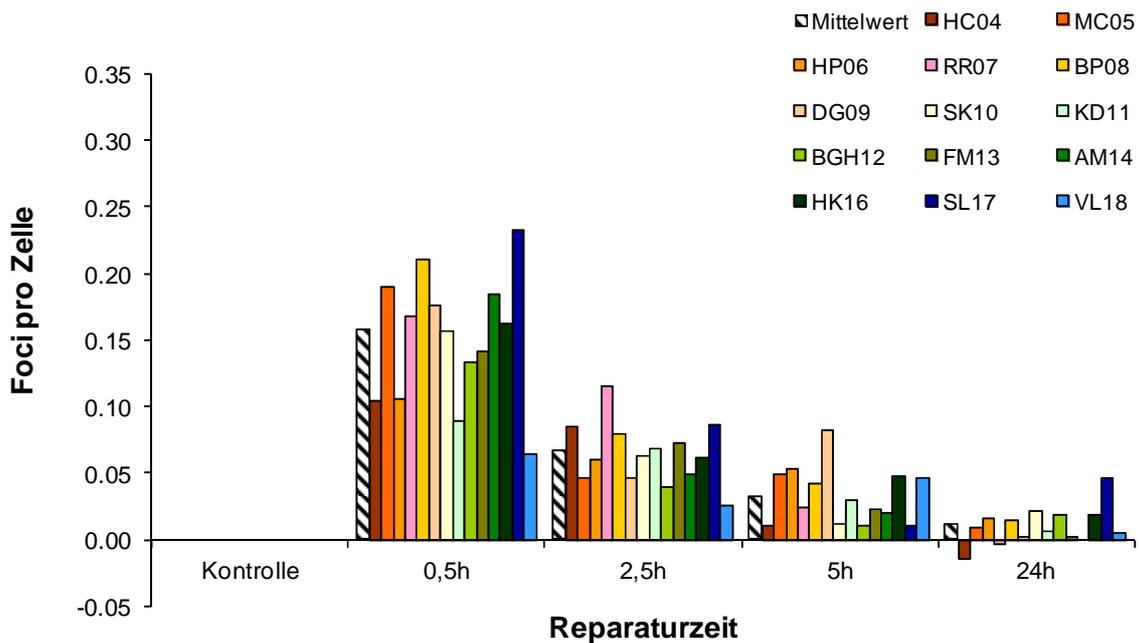


Abbildung 9. DNA-Doppelstrangbruchreparatur *in vivo*.

Bei den dargestellten Daten handelt es sich um die Ergebnisse der *in vivo* Proben aller 14 Patientinnen 0,5, 2,5, 5 und 24 h nach computertomographischer Untersuchung des Thorax. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten auf ein Dosislängenprodukt von $300\text{mGy}\cdot\text{cm}$ normiert. Unspezifischer Hintergrund (messbare Foci in Kontrollproben) wurde von den Daten abgezogen. Für jeden Zeitpunkt ist ein Mittelwert mit abgebildet.

5.5. Vergleichbarkeit von *in vivo* und *ex vivo* Daten

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der *in vivo* und *ex vivo* Daten wurden für alle Versuchsreihen Reparaturquotienten aus den Daten 5h sowie 0,5h nach Strahlenexposition gebildet. Diese wurden mittels Spearman's Rangkorrelation miteinander verglichen (siehe **Tabelle 4**). Eine positive Korrelation mit den *in vivo* Daten konnte in den *ex vivo* Versuchsreihen von 10mGy bis 100mGy nicht statistisch signifikant nachgewiesen werden. In der 500mGy Versuchsreihe zeigte sich sogar eine statistisch signifikante negative Korrelation (Korrelationskoeffizient von -0,653, $p=0,006$).

Patienten	CT	10 mGy	20 mGy	40 mGy	100 mGy	500 mGy
SL17	1	4	5	9	11	7
SK10	2	11	13	6	14	14
BGH12	3	5	10	4	4	9
HC04	4	12	7	13	9	10
AM14	5	3	2	12	3	13
RR07	6	13	3	3	7	11
FM13	7	10	8	11	8	4
BP08	8	7	9	10	5	2
MC05	9	9	11	2	1	8
HK16	10	1	*	1	2	3
KD11	11	2	1	5	6	6
DG09	12	8	12	8	12	5
HP06	13	14	6	*	10	1
VL18	14	6	4	7	13	12
Korrelationskoeffizient		-0,02	-0,148	-0,258	0,007	-0,653
p-Wert		0,473	0,314	0,197	0,491	0,006

Tabelle 4. Rangfolge (1= beste Reparatur bis 14=schlechteste Reparatur) der Reparaturquotienten (5h/0,5h) für *in vivo* (Computertomographie = CT) und *ex vivo* (10 – 500 mGy) Daten. Eine Rangfolgekorrelation wurde für jede einzelne *ex vivo* Versuchsreihe mittels Spearman Rangkorrelation untersucht. Die Ergebnisse sind in der jeweiligen Reihe ganz unten dargestellt.

5.6. Akute strahlenbedingte Hauttoxizität

Nach Abschluss der therapeutischen Radiatio und Nachsorge zeigten alle 14 Patientinnen leichte, strahlenbedingte Hauterscheinungen (siehe **Abbildung 10**). Der ermittelte Gesamtscore war insgesamt jedoch klein und variierte von 1 bis 5 Punkten. Die Patientinnen, die in den *in vivo* Ergebnissen nach computertomographischer Untersuchung aufgrund einer gegenüber dem Mittelwert verstärkten Induktion von DNA-DSBs aufgefallen waren (BP08 und

SL17) zeigten kaum gesteigerte Hautreaktionen (2 Punkte im Gesamtscore). Die stärksten Hautreaktionen (mit einem Punktwert von 5) wurden bei Patientin RR07 beobachtet; deren Proben zeigten aber sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* keine im Vergleich zum Mittelwert gesteigerte DNA-DSBs Induktion. Die geringsten Hautreaktionen (mit einem Punktwert von 1) zeigte Patientin HP06, deren Proben *in vivo* als auch *ex vivo* zu den Zeitpunkten 0,5 und 2,5 h eher unterdurchschnittliche Focizahlen aufwies.

Zur statistischen Prüfung einer möglichen Korrelation der Anzahl an DNA-DSBs und auftretenden Nebenwirkungen wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt (Schwächere Nebenwirkungen = RTOG-Score kleiner 3 Punkte und stärkere Nebenwirkungen = RTOG-Score größer gleich 3 Punkte).

Die Ergebnisse der *in vivo*, als auch *ex vivo* Proben 0,5 h nach Strahlenexposition unterschieden sich in beiden Gruppen nicht voneinander ($t\text{-Test}_{in\ vivo}, p = 0,698$; $t\text{-Test}_{ex\ vivo}, p = 0,587$). Auch fünf Stunden nach Strahlenexposition fanden sich in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ($t\text{-Test}_{in\ vivo}, p = 0,420$; $t\text{-Test}_{ex\ vivo}, p = 0,610$).

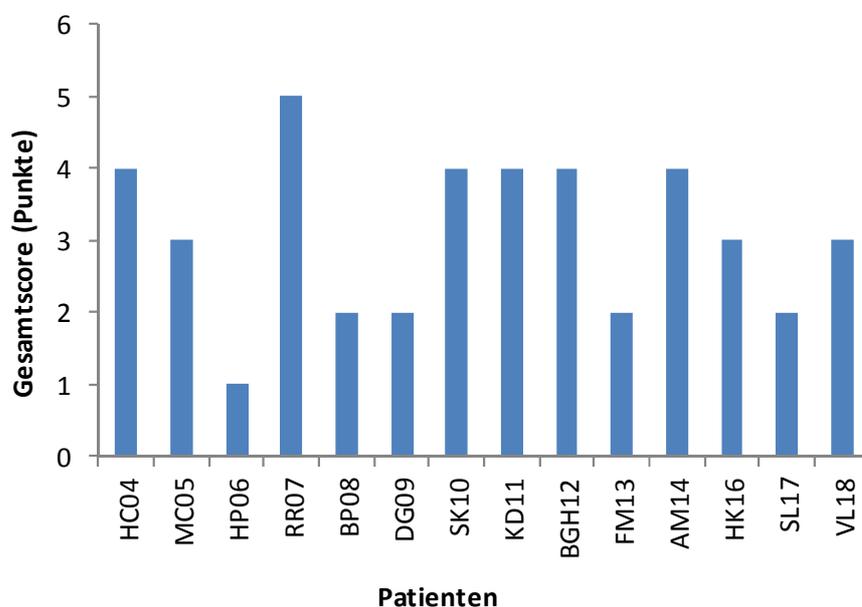


Abbildung 10. Strahlenbedingte Hautreaktionen nach therapeutischer Radiatio der Brust. Darstellung mittels Gesamtpunktzahl im modifizierten RTOG-Score.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reparaturkinetik von strahleninduzierten DNA-DSBs nach computertomographischer Untersuchung des Thorax mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie an Lymphozyten *in vivo* und *ex vivo* bestimmt. Eingeschlossen in die Studie wurden Frauen mit erstmalig diagnostiziertem unilateralem Brustkrebs, die sich nach brusterhaltender Operation zur Planung einer adjuvanten Strahlentherapie vorstellten.

6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl *in vivo*, als auch *ex vivo* war bei allen Patientinnen eine mit fortschreitender Reparaturzeit deutliche Abnahme der Foci-Zahl gegenüber den vorherigen Werten zu erkennen, welche einer Reparatur der DNA-DSBs nach Strahlenexposition entspricht. Die *in vivo* Daten nach computertomographischer Bestrahlung entsprachen in etwa den Daten der *ex vivo* Bestrahlung mit 10 mGy. Bedeutsame interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Reparaturkinetik waren weder *in vivo* noch *ex vivo* nachzuweisen. Eine Korrelation der Reparaturkinetik *in vivo* sowie *ex vivo* mit strahlenbedingten Nebenwirkungen konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Es muss jedoch angemerkt werden, dass in dieser Patientengruppe vorwiegend nur gering ausgeprägte Nebenwirkungen auftraten.

6.2. Methodik

6.2.1. γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie

Im Fokus der vorliegenden Arbeit liegt die angewandte γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zur Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) können DNA-DSBs auch bei Dosen unter 5 Gy zuverlässig nachgewiesen werden (Rothkamm und Löbrich 2003) und machen diese Methode zur sensitivsten ihrer Art.

Die Phosphorylierung des Histons H2AX findet jedoch nicht nur nach strahleninduzierten DSBs statt, sondern auch im Rahmen physiologischer Prozesse. So konnte ein Auftreten von γ -H2AX-Foci zum Beispiel während der DNA-Fragmentation im Rahmen der Apoptose oder in Replikationsgabeln beobachtet werden (Mukheerjee et al. 2006, Ward und Chen 2001). Darüber hinaus konnten ATM-abhängige γ -H2AX-Foci auch während aktiver Zellzykluspha-

sen nachgewiesen werden (McManus und Hendzel 2005). Das Auftreten von γ -H2AX-Foci ist damit nicht in jedem Fall mit DNA-DSBs gleichzusetzen.

In einer 2011 publizierten Studie, in der die an der DNA-Reparatur beteiligten Komponenten mittels Transmissionselektronenmikroskop dargestellt wurden, zeigte sich zudem, dass der Verbund von γ -H2AX-Foci, MDC 1 und 53BP1 ausschließlich an DSB-Brüchen in Heterochromatin und nicht in euchromatischen Domänen vorkam (Rübe et al. 2011).

Ein weiterer kritischer Punkt ist das zeitliche Auftreten von γ -H2AX-Foci nach Induktion von DNA-DSBs. Da es sich bei der Bildung von γ -H2AX-Foci um das Ergebnis einer Reihe von metabolischen Veränderungen handelt, wird das Maximum ihrer Ausprägung, sprich Phosphorylierung, ca. 30-60 Minuten nach Bestrahlung erreicht (Rogakou et al. 1998, Mac Phail et al. 2003). Im Gegensatz dazu können DNA-DSBs mittels PFGE direkt nach ihrer Entstehung nachgewiesen werden. Eine Untersuchung von Kinner et al. aus dem Jahr 2008 vergleicht anschaulich die Kinetik von DNA-DSBs mittels PFGE und γ -H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie. Mit fortschreitender Zeit entspricht sich die Anzahl der dadurch bestimmten DNA-DSBs immer mehr. Im Hinblick auf die Diskussion der Ergebnisse muss also die verzögerte Kinetik von γ -H2AX-Foci nach kurzen Reparaturzeitpunkten berücksichtigt werden. Nach längeren Reparaturzeitpunkten kann hingegen davon ausgegangen werden, dass jeder DNA-DSB mittels γ -H2AX-Foci repräsentiert wird.

Darüber hinaus unterliegt die Auszählung der γ -H2AX-Foci unter dem Mikroskop teilweise der Subjektivität des Untersuchers. Zudem kann eine Überlagerung der Signale bei räumlicher Nähe der Doppelstrangbrüche die Differenzierung zweier Foci erschweren. Um diese methodische Unsicherheit zu minimieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine besonders hohe Anzahl an Zellen beziehungsweise Foci untersucht und Präparate stichprobenartig von einem zweiten, erfahrenen Untersucher gegengezählt. Anzumerken bleibt, dass die manuelle mikroskopische Auswertung mit einem hohen Personal- und Zeitaufwand verbunden ist.

Im Hinblick auf zu erwartende Studien mit größeren Patientenzahlen sind automatisierte Verfahren zwecks besserer Objektivität empfehlenswert. Mittlerweile konnten halbautomatisierte oder vollautomatische Bildanalyseverfahren für Aufnahmen von Laser-Scanning oder Epifluoreszenzmikroskopen bereits erfolgreich eingesetzt werden (Böcker und Iliakis 2006,

Costes et al. 2006). Das Problem der Foci-Überlagerung durch räumliche Nähe kann hier mithilfe mathematischer Filter umgangen werden.

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der γ -H2AX-Foci besteht in der Messung der Gesamtintensität mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting), wodurch ein sehr viel höherer Probendurchsatz möglich ist.

Mittlerweile konnte ein Hochdurchsatz-System entwickelt werden (RABIT = Rapid Automated Biodosimetry Tool), das ca. 30.000 Blutproben pro Tag mittels γ -H2AX Methode analysieren kann (Garty et al. 2010).

6.2.2. Verwendung peripherer Lymphozyten

Ein Vorteil in der Verwendung peripherer Blutlymphozyten liegt in der unkomplizierten Gewinnung des Untersuchungsmaterials, womit eine gute Grundlage für einen prädiktiven klinischen Test entsteht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Ergebnisse an Lymphozyten gut mit denen anderer Gewebe korrelieren (Rübe et al. 2008). Zwar sind zum Beispiel Fibroblasten im Gegensatz zu Lymphozyten auch noch nach 24 Stunden gut zu untersuchen, jedoch ist deren Gewinnung und notwendiges Wachstum schwieriger.

Zudem erwies sich im Rahmen der Methode die Qualität der auszuwertenden Lymphozyten gelegentlich als limitierend, da es häufiger zu einem Zellzerfall während der Aufbereitung kam.

6.2.3. Patientenkollektiv

Die Größe des Patientenkollektivs ist mit 14 untersuchten Patienten gering, so dass die statistische Aussagekraft der Studie eingeschränkt ist. Dennoch sind die Daten valide, da sie insbesondere in Bezug auf dosisabhängige Foci-Induktion und abnehmende Foci-Zahl bei fortschreitender Reparaturzeit mit bisher publizierten Daten vergleichbar sind.

Darüber hinaus ist die Eignung des gewählten Patientenkollektivs aufgrund der geringen Akuttoxizität nach Mammabestrahlung zu diskutieren. Eine Korrelation der Reparaturkinetik nach durchgeführter Computertomographie mit strahlenbedingten Nebenwirkungen konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Auf Grund der nur sehr geringen Akuttoxizität war jedoch auch eine signifikante Differenzierung der Patientinnen erschwert, wenngleich die

Beurteilung der Nebenwirkungen - abgesehen von Pruritus - gut objektivierbar und valide zu erheben waren. Es erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoll, weitere Studien mit Patienten durchzuführen, die auf Grund der Bestrahlungslokalisation größere interindividuelle Ausprägung der Strahlennebenwirkungen aufweisen, um so einen signifikanten Unterschied zu erfassen.

Interessante Daten hierzu liefert eine Untersuchung von 31 Patienten mit Hals-Nasen-Ohren Tumoren, die sich einer therapeutischen Radiatio unterzogen. Hier wurde der Zusammenhang einer insuffizienten DNA-DSBs Reparatur mit dem Auftreten von oraler Mukositis untersucht. Patienten, die 24 h nach Strahlenexposition DNA-DSB-Raten aufwiesen, die mindestens eine Standardabweichung größer als der Mittelwert waren, hatten ein erhöhtes Risiko eine Mukositis des Schweregrads 3 nach WHO zu entwickeln (Fleckenstein et al. 2011).

Die Untersuchung der strahlungsassoziierten Normalgewebstoxizität bei Kindern, die an soliden Tumoren erkrankt waren und einer altersentsprechenden Kontrollgruppe, konnte richtungsweisende Ergebnisse präsentieren. Es zeigte sich, dass alle gesunden Kontrollkinder über effiziente DNA-DSBs Reparaturmechanismen verfügten, wohingegen drei tumor-erkrankte Kinder deutliche Reparaturdefizite aufwiesen. Zwei der drei dieser Kinder zeigten lebensbedrohliche bis letale Normalgewebsreaktionen nach Strahlenexposition (Rübe et al. 2010).

6.3. Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur

6.3.1. Validität / Bedeutung der Methode

Die Validität der Daten wird durch zwei wesentliche Merkmale bestimmt. Zum einen zeigt sich, dass die Anzahl von DNA-DSBs – wie in der Literatur vielfach beschrieben (Lloyd et al. 1976) - dosisabhängig auftritt.

Zum anderen entsprechen die *in vivo* Daten nach computertomographischer Bestrahlung in etwa den Daten der *ex vivo* Bestrahlung mit 10 mGy. Dieses stimmt ziemlich genau mit der in der Literatur angegebenen Strahlenbelastung nach computertomographischer Untersuchung des Thorax überein (Heyer et al. 2007).

Die Zuverlässigkeit der γ -H2AX-Methode in Bezug auf strahlenassoziierte DNA-Schäden wurde bereits vielfach gezeigt (Rothkamm und Löbrich 2003, Fleckenstein et al. 2011).

Kuefner et al. haben in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2010 (auch hier wurde die γ -H2AX-Methode verwendet) postuliert, dass Computertomographie-Protokolle in Zukunft an die individuelle Strahlenempfindlichkeit adaptiert werden könnten, um unnötige Zellschäden zu vermeiden.

Neben Studien, die die Validität der γ -H2AX-Methode nach therapeutischer Bestrahlung oder im Niedrigdosisbereich untersucht haben, existieren mittlerweile auch Daten zur Verlässlichkeit nach Hochdosisbestrahlung (Redon et al. 2010). Nach Ganzkörperbestrahlung von nicht-menschlichen Primaten mit nicht-letal bis letaler Dosis, konnten anhand von γ -H2AX-Foci aus Lymphozyten und/ oder Haarfollikeln noch 4 Tage nach Bestrahlung realistische Werte der initial angewandten Bestrahlungsdosis bestimmt werden (Redon et al. 2010).

Der Anwendungsbereich der γ -H2AX-Methode beschränkt sich jedoch nicht nur auf den radiotherapeutischen/-diagnostischen Bereich.

Die Praktikabilität des γ -H2AX Assays als pharmakodynamischer Marker DNA-interferierender Chemotherapeutika konnte bereits in mehreren Laboren nachgewiesen werden (Kinders et al. 2010). Wang und Kollegen konnten im Jahr 2010 zeigen, dass sich die γ -H2AX- Level in zirkulierenden Tumorzellen gut zum Monitoring von Patienten unter Chemotherapie eignen (Wang et al. 2010).

6.3.2. Abweichung der beobachteten Werte von der Poisson-Verteilung

Da nur ein Teil des Blutvolumens und folglich nur eine gewisse Anzahl an Lymphozyten zum Zeitpunkt der computertomographischen Untersuchung ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, ist eine Abweichung der beobachteten Werte von der statistischen Poissonverteilung zu erwarten. Die beobachteten und statistisch ermittelten Daten der *in vivo* Bestrahlung unterscheiden sich jedoch nicht signifikant.

Ein möglicher Erklärungsansatz für den so geringen Unterschied mag darin liegen, dass im Bestrahlungsfeld unter anderem das Herz, die Pulmonalgefäße und die Aorta liegen, auf die ein Großteil des Herzzeitvolumens entfällt. Darüber war die Bestrahlungszeit aufgrund der Verwendung eines Zweizeiler - Computertomographen relativ lang, so dass trotz beschränkten Bestrahlungsfelds vermutlich ein Großteil der Lymphozyten ionisierender Strahlung ausgesetzt war.

Signifikante Unterschiede sind für Hochdosisbestrahlungen einzelner Körperteile zu erwarten (Therapeutische Bestrahlung).

Im Gegensatz zu den *in vivo* Proben, ist bei *ex vivo* Bestrahlung eine Übereinstimmung der beobachteten Werte mit den statistisch ermittelten Werten zu erwarten, da die komplette Probe ionisierender Strahlung ausgesetzt war. In der vorliegenden Arbeit konnte dies auch so nachgewiesen werden.

6.3.3. Vergleichbarkeit von *in vivo* und *ex vivo* Daten

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation der *in vivo* Ergebnisse mit den Daten der *ex vivo* Versuchsreihen nachgewiesen werden.

Ähnliches wurde in einer Studie von Sak et al. aus dem Jahr 2007 gezeigt. Die Autoren untersuchten die Korrelation zwischen der Anzahl an γ -H2AX -Foci in peripheren Lymphozyten mit der Gesamtkörper-Strahlendosis bei Tumorpatienten. Hier fielen in Abhängigkeit des bestrahlten Körperteils signifikante Unterschiede zwischen den *in vivo* und *ex vivo* Studienarmen auf. Die Autoren erklären dies durch bislang noch nicht verstandene *in vivo* Mechanismen nach Strahlenexposition

Im Gegensatz dazu beschrieben Kuefner et al. im Jahr 2010 eine gute Vergleichbarkeit beider Methoden. Hierbei wurde die Anzahl von strahleninduzierten DNA-DSBs mittels γ -H2AX Methode bei 19 Patienten untersucht, die verschiedene angiographische Untersuchungen wahrnahmen. Die Ergebnisse der *in vivo* und *ex vivo* Proben waren sehr ähnlich.

Zur besseren Evaluation von o.g. Diskrepanz sind weitere vergleichende Arbeiten von *in vivo* und *ex vivo* Daten mit größeren Patientenzahlen nötig.

6.3.4. Individuelle Strahlenempfindlichkeit

Auf molekularer Ebene konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass persistierende DNA-Schäden mit einer erhöhten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und einer damit einhergehenden Normalgewebstoxizität assoziiert sind (Rodier et al. 2009, Okunieff et al. 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass auch genetische Defekte im Reparaturmechanismus zu einer erhöhten Strahlensensibilität führen (McKinnon 2004).

Ähnliches wird auch für γ -H2AX Knock-out Zellen berichtet (Bassing et al. 2002).

Im untersuchten Patientenkollektiv konnte jedoch sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* keine strahlenbedingten Überreaktionen festgestellt werden.

Frühere Arbeiten weisen darauf hin, dass bei der Untersuchung von Patienten mit bekannten Reparaturdefekten deutliche Abweichungen vom Mittelwert auftreten (Löbrich et al. 2005).

Diese Abweichungen betrafen sowohl die *ex vivo*, als auch *in vivo* Messung.

Ein in oben genannter Publikation vorgestellter Patient mit erheblichen Nebenwirkungen nach einer Strahlentherapie des Beckens wies so zum Beispiel 24 Stunden nach Computertomographie *in vivo* nahezu zwanzigfach mehr Doppelstrangbrüche auf als das restliche Kollektiv.

Um die Sensitivität der Methode für die Identifikation von Risikopatienten gerade auch im Niedrigdosisbereich zu optimieren, sind weitere Untersuchungen von Patienten mit bekanntem Reparaturdefekt notwendig.

6.4. Fazit und Ausblick

Die klinische Strahlenempfindlichkeit variiert stark zwischen einzelnen Individuen (Burnet et al. 1994). Schon mehrfach wurde die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci als Prädiktor für die Ausprägung radiogener Früh- und Spätnebenwirkungen untersucht (Kao et al. 2006, Kelley und Fishel 2008, Rube et al. 2010, Fleckenstein et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die γ -H2AX Methode es ermöglicht, valide Daten zum individuellen Reparaturvermögen von Patienten, die sich einer diagnostischen Bestrahlung unterziehen, zu erheben. Im Einzelfall können diese auf eine höhere Strahlenempfindlichkeit hinweisen. Im untersuchten Kollektiv der hier dargestellten Arbeit war jedoch offenkundig keine Patientin mit einem Reparaturdefekt enthalten. Eine bessere Vorhersage der Behandlungsverträglichkeit hätte potenzielle Auswirkungen auf die Wahl der strahlentherapeutischen Gesamtdosis und Fraktionierung, sowie insbesondere auf das Therapiemonitoring und die jeweilige Supportivtherapie.

Literaturverzeichnis

1. Bartek J, Lukas J (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19: 238-245
2. Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8173-8178
3. Bassing CH, Alt FW (2004) The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA repair (Amst)* 3: 781-796
4. Batty DP, Wood RD (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241: 193-204
5. Baumann M, Hölscher T, Begg AC (2003) Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* 69: 121-125
6. Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M. B., Bartek J. und Lukas J (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* 173: 195-206
7. Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol* 4: 68-80
8. Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6:702–713
9. Birren BW, Lai E, Clark SM, Hood L, Simon MI (1988) Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res* 16: 7563-7582
10. Böcker W, Iliakis G. (2006). Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res* 165(1): 113-124
11. Brenner DJ, Ward JF (1992) Constraints on energy deposition and target size of multiply-damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 61: 737-748
12. Burma S, Chen BPC, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5: 1042-1048
13. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH (1994). The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother. Oncol* (33), 228-238
14. Chargari C, Kirova YM, Even C, Monnier L, Dendale R, Campana F, Fourquet A (2009) Adjuvant irradiation in breast cancer patients with ATM gene heterozygous mutations: special focus on clinical efficacy/toxicity. *Cancer Radiother* 13: 164-172

15. Connell PP, Hellman S (2009) Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective. *Cancer Res* 69: 383-39
16. Costes S. V., Boissiere A., Ravani S., Romano R., Parvin B. und Barcellos-Hoff M. H. (2006). Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat Res* 165(5): 505-515
17. Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ (2000) The importance of repair stalled replication forks. *Nature* 404: 37-41
18. Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol* 7: 588-598
19. Edwards AA, Lloyd DC, Purrot RJ (1979) Radiation induced chromosome aberrations and the Poissonian distribution. *Radiat Environ Biophys* 16: 89-100
20. Fang Z, Kozlov S, McKay MJ, Woods R, Birrell G, Sprung CN, Murrell DF, Wangoo K, Teng L, Kearsley JH, Lavin MF, Graham PH, Clarke RA (2010) Low levels of ATM in breast cancer patients with clinical radiosensitivity. *Genome Integr* 1: 9
21. Fernet M, Hall J (2004) Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair* 3: 1237-1243
22. Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, Fricke A, Rube CE, Rube C (2011). The Impact of Individual in vivo Repair of DNA Double-strand Breaks on Oral Mucositis in Adjuvant Radiotherapy of Head-and-Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81 (5): 1465-1472
23. Garty G, Chen Y, Salerno A, Turner H, Zhang J, Lyulko O, Bertucci A, Xu Y, Wang H, Simaan N, Randers-Pehrson G, Yao YL, Amundson SA, Brenner DJ (2010). The RABIT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. *Health Phys.* 98:209–21
24. Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP (2003) MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421: 952-956
25. Green MH, Waugh AP, Lowe JE, Harcourt SA, Cole J, Arlett CF (1994) Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-B and UV-C irradiation. *Mutat Res* 5: 25-32
26. Haber JE (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16: 259-264
27. Harrison JC, Haber JE (2006) Surviving the break-up: The DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40: 209-235
28. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* 6: 923-935

29. Heyer CM, Peters S, Lemburg S, Nicolas V (2007). Einschätzung der Strahlenbelastung radiologischer Thorax-Verfahren: Was ist Nichtradiologen bekannt? *RöFo: Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren*, 179(3):261-267
30. Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, Green S, Haffty B, Drumea K, Leitzin L, Kuten A, Azria D, Ozsahin M, Overgaard J, Andreassen CN, Trop CS, Park J, Rosenstein BS (2006) Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the GENE-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65: 646-655
31. Hoeijmakers HJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374
32. Holliday R (1964) The induction of mitotic recombination by mitomycin C in *ustilago* and *saccharomyces*. *Genetics* 50: 323-335
33. Jeggo PA (1997) DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutat Res* 384: 1-14
34. Johnson RD, Jasin M (2001) Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 29: 196-201
35. Kao J, Milano MT, Javaheri A, Garofalo MC, Chmura SJ, Weichselbaum RR, Kron SJ (2006) Gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 197-205
36. Kelley MR, Fishel ML (2008) DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 8: 417-25
37. Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27: 247-254
38. Kim DR, Park SJ, Oettinger MA (2000) V(D)J recombination: site-specific cleavage and repair. *Mol Cells* 10: 367-374
39. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36: 5678-5694
40. Kinders RJ, Hollingshead M, Lawrence S, Ji J, Tabb B, Bonner WM, Pommier Y, Rubinstein L, Evrard YA, Parchment RE, Tomaszewski J, Doroshow JH (2010). Development of a validated immunofluorescence assay for gammaH2AX as a pharmacodynamic marker of topoisomerase I inhibitor activity. *Clin Cancer Res* 16: 5447-5457
41. Kobayashi J (2004) Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA-double strand breaks: NBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT domain. *J Radiat Res (Tokyo)* 45: 473-48

42. Kuefner MA, Grudzenski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, Lobrich M, Uder M. DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol.* 2009;44:440–446
43. Kuefner MA, Grudzenski S, Hamann J, Achenbach S, Lell M, Anders K, Schwab SA, Haberle L, Lobrich M, Uder M (2010). Effect of CT scan protocols on x-ray-induced DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing coronary CT angiography. *Eur Radiol* 20: 2917–292
44. Kuo LJ, Yang LX (2008) Gamma H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22: 305-309
45. Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998) The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273: 1794- 1801
46. Li ZY, Otevrel T, Gao YJ, Cheng HL, Seed B, Stamato TD, Taccioli GE, Alt FW (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 83:1079-1089
47. 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
48. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3: 817-826
49. Lloyd DC, Purrott PJ, Dolphin GW, Edwards AA (1976) Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron irradiation. *Int Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 29:169-182
50. Löbrich M, Ikpeme S, Haub P, Weber KJ, Kiefer J (1993) DNA double strand break induction in yeast b X-rays and alpha particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 64: 539-546
51. Löbrich M, Ikpeme S, Kiefer J (1994) 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
52. Löbrich M, Jeggo PA (2005) Harmonising the response to DSBs: a new string on the ATM bow. *DNA Repair (Amst)* 4: 749-759
53. Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci* 102: 8984-8989
54. 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

55. MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL (2003). Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 79: 351-358
56. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimimi N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316: 1160-1166
57. McKinnon PJ (2004) ATM and ataxia teleangiectasia. *EMBO Rep* 5: 772-776
58. McManus KJ, Hendzel MJ (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025
59. Misteli T, Soutoglou E (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature Rev Mol Cell Biol* 10: 243-254
60. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi , Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* 5:575-590
61. 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
62. O'Driscoll M, Gennery AR, Seidel J, Concannon P, Jeggo PA (2004) An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair (Amst)* 3: 1227-1135
63. Okunieff O, Chen Y, Maguire DJ, Huser AK (2008) Molecular markers of radiation-related tissue toxicity. *27:363-374*
64. Olive PL (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionization radiation. *Radiat Res* 150: 42-51
65. Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122: 86-94
66. Pang D, Yoo S, Dynan WS, Jung M, Dritschilo A (1997) Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res* 57: 1412-1415
67. Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 349-404
68. Paull TT, Gellert M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1: 969-979

69. Paull TT, Gellert M (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13: 1276-1288
70. Paull TT, Lee JH (2005) The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4: 737-740
71. Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon A, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci in DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81: 123-129
72. Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G (2004) Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104: 7-13
73. Povirk LF, Wubter W, Kohnlein W, Hutchinson F (1977) DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by Bleomycin. *Nucleic Acids Res* 4: 3573-3580
74. Redon CE, Nakamura AJ, Gouliava K, Rahman A, Blakely WF, Bonner WM (2010) The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One* 5: e15544
75. Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying after DNA damage. *Nature* 407: 777-783
76. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11:973-979
77. Röper B, Kaisig D, Auer F, Mergen M, Molls M (2004) Thêta-Cream® versus Bepanthol® Lotion in Breast Cancer Patients under Radiotherapy. A New Prophylactic Agent in Skin Care? *Strahlenther Onkol* 180: 315–322
78. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146: 905-915
79. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induced histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868
80. Rothkamm K, Löbrich M (1999) Misrejoining of DNA double-strand breaks in primary and transformed human and rodent cells: a comparison between the HPRT region and other genomic locations. *Mutat Res* 433: 193-205
81. 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. *Prog Natl Acad Sci USA* 100: 5057- 5062
82. Rothkamm K, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2001) Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 61: 3886-93

83. Rothkamm K, Krüger I, Thompson L, Löbrich M (2003) Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706–5715
84. Rouse J, Jackson SP (2002) Interfaces between the detection, signaling and repair of DNA damage. *Science* 297: 547-551
85. Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rube C (2005) The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:1482-1492
86. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C (2008). DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a pre-clinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 15;14(20): 6546-6455
87. Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rube C (2010). DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78(2):359-369
88. Rube CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C (2011). DNA repair in the context of chromatin: New molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair* 10: 427–437
89. Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrün S, Pöttgen C, Groneberg M, Stuschke M (2007). gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment. *Int J Radiat Biol* 83(10): 639-52
90. Savage JR (1970) Sites of radiation induced chromosome exchanges. *Curr Top Radiat Res Q* 6: 129-194
91. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
92. Smith GCM, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916-934
93. Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S (2006) Differential usage of non-homologous-endjoining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 5: 1021-1029
94. Stucki M, Jackson SP (2006) gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 5: 534-543
95. Stucki M, Clapperton JA, Mohammed D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SO (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular response to DNA double-strand breaks. *Cell* 123: 1213-1226

96. Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW (1983) Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res* 112: 23-32
97. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeka Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* 22: 5612-5621
98. Wang LH, Pfister TD, Parchment RE, Kummar S, Rubinstein L, Evrard YA, Gutierrez ME, Murgo AJ, Tomaszewski JE, Doroshov JH, Kinders RJ (2010). Monitoring drug-induced gamma H2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 16: 1073-1084
99. Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and reparability. *Prog Nucl Acids Mol Biol* 35: 95-125
100. Ward JF (1994) The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 66: 427-432
101. Ward JF (1995) Radiation mutagenesis: The initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142: 362-368
102. Ward JF, Blakely WF, Joiner EI (1985) Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxy radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res* 103: 383-392
103. Ward JF, Evans JW, Limoli CL, Calabro-Jones PM (1987) Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer* 55: 105- 112
104. Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276:47759-47762
105. Yuan J, Chen J (2010) MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *J Biol Chem* 285: 1097-1104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen (aus Shiloh 2003).	11
Abbildung 2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von γ -H2AX-Foci in Lymphozyten. 19	
Abbildung 3. Beobachtete Häufigkeit (blau) und zu erwartende Häufigkeit nach Poisson (rot) von γ -H2AX-Foci 0,5 h nach Strahlenexposition durch Computertomographie (<i>in vivo</i>).	22
Abbildung 4. Beobachtete Häufigkeit (blau) und zu erwartende Häufigkeit nach Poisson (rot) von γ -H2AX-Foci 0,5 h nach Strahlenexposition mit 10 mGy (<i>ex vivo</i>)	23
Abbildung 5. Dosisabhängige Foci-Induktion 0,5h nach Strahlenexposition.....	24
Abbildung 6. DNA-DSB Reparaturverlauf für unterschiedliche Bestrahlungsdosen.....	25
Abbildung 7. DNA-Doppelstrangbruchreparatur <i>ex vivo</i> nach einer Bestrahlung mit 10mGy.	26
Abbildung 8. DNA-Doppelstrangbruchreparatur <i>ex vivo</i> nach einer Bestrahlung mit 100mGy.	27
Abbildung 9. DNA-Doppelstrangbruchreparatur <i>in vivo</i>	28
Abbildung 10. Strahlenbedingte Hautreaktionen nach therapeutischer Radiatio der Brust. Darstellung mittels Gesamtpunktzahl im modifizierten RTOG-Score.	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Versuchsaufbau	16
Tabelle 2. Modifizierter RTOG - Score für akute Strahlennebenwirkungen an der Brusthaut (siehe Röper et al. 2004).	20
Tabelle 3. Demographische und klinische Parameter des untersuchten Patientenkollektivs..	21
Tabelle 4. Rangfolge (1= beste Reparatur bis 14=schlechteste Reparatur) der Reparaturquotienten (5h/0,5h) für <i>in vivo</i> (Computertomographie = CT) und <i>ex vivo</i> (10 – 500 mGy) Daten.	29

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rube, dem Leiter der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität des Saarlandes, für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation und die wissenschaftliche Betreuung in dieser Zeit.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. J. Fleckenstein, der stets uneingeschränkt hilfsbereit in allen Fragestellungen war; ohne seine Hilfe und Betreuung wäre diese Arbeit niemals entstanden. Seine Geduld mit mir war bemerkenswert.

Mein Dank gilt auch der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie, Frau Prof. Dr. med. C. E. Rube, insbesondere für die Einarbeitung in die Labortätigkeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragestellungen.

Dank an Herrn Dr. rer. nat. M. Kühne für die enge Zusammenarbeit während der Laborzeit, der Hilfe bei der statistischen Ausarbeitung und die vielen Ideen zur Durchführung der Arbeit.

Vielen Dank auch an D. Ludwig für die Hilfe während der Labortätigkeit und an die Mitarbeiter des Instituts für Biophysik der Universität des Saarlandes, welche unsere *ex vivo*-Bestrahlungen durchführten und uns in die Methode einarbeiteten.

H. Bungert und P. Melchior – das war eine gute Zeit!

Meiner Frau Lisa danke für alles.

Lebenslauf

Name: Matthias Strobel
Geburtsdatum- und Ort: 19. August 1978 in Neunkirchen/Saar

Schulausbildung

1985-1998: Besuch der Freien Waldorfschule Bexbach bis zum Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife (Zentralabitur des Saarlandes)

Studium

10/2000-08/2003 Vorklinisches Studium an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar mit Abschluss der ärztlichen Vorprüfung
10/2003-08/2007 Klinisches Studium an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
10/2007 Staatsexamen

Berufstätigkeit

01/2008-06/2009 und
01/2010-03/2010 Assistenzarzt der internistischen Abteilung der Ammerlandklinik Westerstede
07/2009-12/2009 Assistenzarzt der anästhesiologischen Abteilung der Ammerlandklinik Westerstede
04/2010-12/2010 Assistenzarzt Rettungsstelle Helios-Klinik Berlin-Buch
Seit 01/2011 Assistenzarzt der internistischen Abteilung der Oberhavel-Klinik Hennigsdorf