

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

**Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in den kortikalen Neuronen juveniler Mäuse  
nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Wolfgang Marc Funk  
geb. am: 04. April 1989 in Aalen

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Strahlentherapie von ZNS-Tumoren im Kindesalter .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Epidemiologie.....	3
2.1.2	Klinische Nebenwirkungen .....	3
2.1.3	Fortschritte durch neue hochkonformale Bestrahlungstechniken .....	4
2.1.4	Strahlentherapie der ZNS-Tumore im Kindesalter heute .....	5
<b>2.2</b>	<b>Das Linear Non-Threshold Modell.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>DNA-Doppelstrangbrüche .....</b>	<b>7</b>
2.3.1	DNA und Chromatin .....	7
2.3.2	Entstehung von Doppelstrangbrüchen.....	9
2.3.3	Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	10
2.3.4	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Neuronen .....	10
<b>2.4</b>	<b>Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen .....</b>	<b>13</b>
2.4.1	Historische Entwicklung .....	13
2.4.2	p53-Binding Protein 1 .....	13
2.4.3	Anlagerung des 53BP1 an DNA-Doppelstrangbrüche.....	14
2.4.4	53BP1-Foci in Neuronen .....	16
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
4.1.1	Antikörper.....	18
4.1.2	Geräte und Messinstrumente .....	19

4.1.3	Reagenzien und Lösungen.....	20
4.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	21
<b>4.2</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>22</b>
4.2.1	Mausstamm und Haltungsbedingungen .....	22
4.2.2	Bestrahlung der Versuchstiere.....	22
4.2.2.1	Bestrahlungsparameter .....	22
4.2.2.2	Bestrahlungsplan und Zeitpunkt der Gewebeentnahme .....	22
4.2.3	Gewebeentnahme und -Aufarbeitung.....	23
4.2.3.1	Intrakardiale Perfusion, Gewebeentnahme und Formalinfixation.....	23
4.2.3.2	Paraffineinbettung .....	24
4.2.3.3	Erstellen der Gewebeschnitte .....	25
4.2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	25
4.2.3.5	Mikroskopische Auswertung und Dokumentation.....	26
4.2.4	Datenerfassung - Statistische Auswertung .....	26
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Darstellung der kortikalen Neuronen.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Darstellbarkeit strahlungsinduzierter Foci.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3</b>	<b>53BP1-Foci in fraktioniert bestrahlten und unbestrahlten kortikalen Neuronen .....</b>	<b>30</b>
5.3.1	Einfluss zunehmend fraktionierter Bestrahlung auf die Focuszahl/Neuron.....	30
5.3.2	Langzeitentwicklung der 53BP1-Focuszahl/Neuron.....	33
5.3.3	Altersabhängige Entwicklung der 53BP1-Focuszahl/Neuron.....	34
<b>5.4</b>	<b>Anteil Focus-tragender Neurone fraktioniert bestrahlter und unbestrahlter Mäuse .....</b>	<b>34</b>
5.4.1	Einfluss zunehmend fraktionierter Bestrahlung auf den Anteil Focus-tragender Neurone .....	35
5.4.2	Langzeitentwicklung des Anteils 53BP1-Focus-tragender Neurone .....	36
5.4.3	Altersabhängige Entwicklung des Anteils 53BP1-Focus-tragender Neurone.....	36
<b>5.5</b>	<b>Zusammenhang zwischen Focuszahl/Neuron und Anteil Focus-tragender Neurone .....</b>	<b>37</b>

<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse .....</b>	<b>39</b>
6.1.1	Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach <i>fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse</i> im Vergleich zu <i>einmalig bestrahlten adulten Mäusen</i> .....	39
6.1.2	Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach <i>fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse</i> im Vergleich zu <i>fraktioniert bestrahlten adulten Mäusen</i> .....	42
6.1.3	Einfluss des Alters der Kontrollmäuse auf die Akkumulation von DSBs.....	44
<b>6.2</b>	<b>Zeitliche Entwicklung der Anzahl persistierender DSBs nach fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse .....</b>	<b>46</b>
6.2.1	Zeitliche Entwicklung der Anzahl von DSBs nach <i>fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse</i> im Vergleich zu <i>fraktioniert bestrahlten adulten Mäusen</i> .....	47
6.2.2	Zeitliche Entwicklung der Anzahl von DSBs nach <i>fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse</i> im Vergleich zu <i>einmalig hochdosiert bestrahlten adulten Mäusen</i> .....	49
<b>6.3</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>Diskussion der Methodik .....</b>	<b>51</b>
6.4.1	Das in vivo Modell Maus .....	51
6.4.2	Bestrahlung.....	51
6.4.3	Intrakardiale Formalin-Perfusion .....	52
6.4.4	Fixation mit Formalin.....	53
6.4.5	Lichtmikroskopische Quantifizierung der Foci.....	54
6.4.5.1	Lichtmikroskopische Quantifizierung der Foci – Pulsfeldgelelektrophorese.....	54
6.4.5.2	Manuelles Auszählen – Computer-basiertes Verfahren.....	55
6.4.5.3	Lichtmikroskopie – Transmissionselektronenmikroskopie.....	56
6.4.6	Bedeutung der persistierenden Foci .....	57
<b>6.5</b>	<b>Klinische Relevanz.....</b>	<b>59</b>

<b>6.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>62</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>7.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>7.4</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>DANK .....</b>	<b>77</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>78</b>

## 1 Zusammenfassung/Summary

### 1.1 Zusammenfassung

*Hintergrund und Zielsetzung:* In der Therapie von ZNS-Tumoren bei Kindern kommen zunehmend hochkonformale Bestrahlungstechniken wie die Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) zum Einsatz. Dadurch werden zwangsläufig größere Volumina gesunden Gewebes, wenn auch mit einer geringeren Dosis als zuvor, bestrahlt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Anzahl potentieller DNA-Schäden in den kortikalen Neuronen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung mit Hilfe des in vivo Modell juveniler Mäuse zu erfassen.

*Methodik:* Juvenile Mäuse wurden über ein, zwei, drei oder vier Wochen jeweils täglich von Montag bis Freitag niedrig dosiert (jeweils 100 mGy pro Tag) bestrahlt. Die DNA-Doppelstrangbrüche wurden anhand der 53BP1-Foci dargestellt. Diese wurden in den Neuronen des zerebralen Kortex 72 Stunden nach der letzten Bestrahlung sowie in den Neuronen der über vier Wochen bestrahlten Mäuse zusätzlich ein, drei und sechs Monate nach der letzten Bestrahlung gezählt.

*Ergebnisse:* Mit zunehmender Dauer und damit zunehmender Dosis der fraktionierten Bestrahlung stieg die Focuszahl/Neuron linear an. Ein signifikanter Rückgang der Focuszahl/Neuron war erstmals 6 Monate nach Bestrahlung zu beobachten. Das Niveau der unbestrahlten Kontrollen wurde nicht erreicht.

*Schlussfolgerung:* Die fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung führt mit steigender Dosis zu einer Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen in den kortikalen Neuronen juveniler Gehirne. Die lange Persistenz dieser DNA-Schäden, verglichen mit den Daten für adulte Mäuse in der Literatur, deutet zudem auf eine gesteigerte Vulnerabilität des juvenilen Gehirns im Langzeitverlauf nach fraktionierter Bestrahlung hin. Die vorliegende Arbeit liefert damit erste Hinweise, dass bei Kindern selbst niedrige Strahlendosen, wie sie im Randbereich von Zielvolumina auftreten, nicht zu vernachlässigen sind.

*Ausblick:* Gegenstand weiterführender Untersuchungen sollte der Zusammenhang zwischen den persistierenden 53BP1-Foci und ihren möglichen neurofunktionellen Auswirkungen sein.

## 1.2 Summary

*Background and purpose:* In the treatment of CNS tumours of children new highly conformal radiation techniques, e.g. intensity-modulated radiation therapy (IMRT) are increasingly used. Thus inevitably larger volumes of healthy tissue are irradiated, albeit with lower doses than before. Aim of the present work is to assess the number of potential DNA lesions in cortical neurons after fractionated low dose irradiation with the help of the in vivo model of juvenile mice.

*Methods:* Juvenile mice were irradiated daily with low dose (100 mGy per day) one, two, three or four weeks, respectively, from Monday to Friday. DNA double-strand breaks were visualized by 53BP1 foci. They were counted in neurons of the cerebral cortex 72 hours after the last irradiation as well as in the neurons of mice irradiated over four weeks one, three and six months, respectively, after the last fraction.

*Results:* With increasing time and thus total dose of fractionated irradiation the number of foci per neuron linearly increased. A significant decrease of the number of foci per neuron was monitored 6 months after irradiation for the first time. The level of unirradiated control mice was not reached.

*Conclusion:* Fractionated low dose irradiation with increasing cumulative doses leads to an accumulation of DNA double-strand breaks in cortical neurons of juvenile brains. The long persistence of these DNA lesions compared to data in adult mice in literature suggests an enhanced long-term vulnerability of the juvenile brain. The present work implies, that in children even low radiation doses which occur in the periphery of the target volumes are not to be neglected.

*Prospects:* Further studies should aim to clarify the relation between the persistence of 53BP1-foci and its potential neurofunctional effects.

## 2 Einleitung

Die Strahlentherapie ist integraler Bestandteil der Behandlung maligner Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS) bei Kindern. Das Ziel der Radiotherapie ist die optimale Tumorkontrolle bei möglichst geringen strahlungsbedingten Nebenwirkungen. Hierzu muss die notwendige therapeutische Strahlendosis im Zielvolumen erreicht, jedoch gleichzeitig das umliegende Gewebe weitestgehend geschont werden (Bindra RS et Wolden SL, 2016; Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Neue hochkonformale Bestrahlungstechniken in der Radioonkologie wie die Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) nutzen mehr Bestrahlungsfelder als vorhergehende Verfahren. Diese kreuzen sich im Zielvolumen und erlauben es, das Bestrahlungsvolumen sehr genau an das Zielvolumen anzupassen. Unweigerlich werden dadurch größere Volumina gesunden Gewebes – wenn auch mit geringerer Dosis als zuvor – bestrahlt (Hall EJ et Wu CS, 2003). Durch Strahlung entstehen DNA-Doppelstrangbrüche, die die entscheidende radiobiologische Läsion darstellen (Goodhead DT, 1994). Die vorliegende Arbeit nutzt 53BP1 als Marker, um potentielle DNA-Doppelstrangbrüche nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung in Neuronen juveniler Mäuse zu detektieren.

### 2.1 Strahlentherapie von ZNS-Tumoren im Kindesalter

#### 2.1.1 Epidemiologie

Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) stellen im Kindesalter mit 24,7% nach den hämatologischen Neubildungen die häufigste Tumorgruppe dar. Davon sind etwa 50% den Astrozytomen zuzuordnen. Weiterhin zählen zu den ZNS-Tumoren Medulloblastome, Ependymome und Kraniopharyngeome (Kaatsch P et Spix C, 2015). Während die meist benignen Astrozytome die häufigsten Tumoren sind, sind die Medulloblastome die häufigsten malignen ZNS-Tumoren im Kindesalter (Thorp NJ et Taylor RE, 2014).

#### 2.1.2 Klinische Nebenwirkungen

Die Behandlung von ZNS-Tumoren des Kindesalters baut auf die drei Säulen der chirurgischen Intervention, der Chemotherapie und der Strahlentherapie auf (Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Mit dem Einsatz der Strahlentherapie wurden diese heilbar (Bindra RS et Wolden SL, 2016).

Beginnend in den 1960ern wurden große Bestrahlungsfelder und hohe Strahlendosen genutzt, um die ZNS-Tumoren im Kindesalter heilen zu können (Bindra RS et Wolden SL, 2016). Als die ersten irreversiblen Langzeitfolgen bekannt wurden, schränkten diese die strahlentherapeutische Behandlung insbesondere bei sehr jungen Kindern zunehmend ein

(Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Zu diesen Langzeitfolgen zählen Wachstumsretardierung, Endokrinopathien, Sekundärmalignome und neurologische Defizite (Bindra RS et Wolden SL, 2016).

Einige Langzeitfolgen treten erst ab einer Schwellendosis in der Größenordnung von 20 Gy auf. Endokrinopathien wie der Mangel an Wachstumshormon nehmen dann dosisabhängig zu. Die kumulative Inzidenz der Sekundärmalignome 20 Jahre nach einer Strahlentherapie ist mit 3,3 % gegenüber 1,2 % ohne diese erhöht. Hierbei ist im Gegensatz zu dem genannten Beispiel der Endokrinopathien aber keine Schwellendosis bekannt (Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Kognitive Defizite wurden hauptsächlich nach der Therapie von Kindern mit Tumoren der hinteren Schädelgrube, speziell von Medulloblastomen und Ependymomen, beschrieben (Mulhern RK et al., 2004). Hierbei zeigten Studien insbesondere von Kindern, die jünger als 3-4 Jahre waren, erschreckende Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit durch die kraniospinalen Bestrahlung mit hohen Dosen auf (Mulhern RK et al., 2004; Walter AW et al., 1999). Es konnte beobachtet werden, dass eine langfristige Abnahme des Intelligenzquotienten (IQ) umso stärker ausgeprägt war, je jünger die bestrahlten Kinder waren (Merchant TE et al., 2009). Selbst Kinder, die nur mit einer mittleren Dosis von 1,3 Gy bestrahlt wurden, zeigten niedrigere IQs und schlechtere Schulnoten (Ron E et al., 1982).

### **2.1.3 Fortschritte durch neue hochkonformale Bestrahlungstechniken**

Strahlungsquellen im Megavoltbereich machten es möglich, die Haut zu schonen und tief im Gewebe liegende Tumoren zu bestrahlen, ohne die Toleranzdosis der Risikoorgane zu überschreiten. Mit der Entwicklung der Computertomographie 1971 folgte der zweidimensionalen die dreidimensionale Planung der Bestrahlungsvolumina. Die Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) verbesserte in den frühen 2000ern die Konturierung der Tumore weiter (Thariat J et al., 2013). Dadurch konnten die erheblichen Nebenwirkungen in der Therapie kindlicher ZNS-Tumoren bei fortbestehender Tumorkontrolle reduziert werden (Bindra RS et Wolden SL, 2016; Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Die IMRT nutzt mehr Bestrahlungsfelder als die dreidimensionale konventionelle Strahlentherapie (3D-CRT). Ihr zunehmender Einsatz führt jedoch unweigerlich zur Bestrahlung größerer Volumina gesunden Gewebes, wenn auch mit einer geringeren Dosis (s. Abbildung 2.1). Dies kann mit einem gesteigerten Risiko für strahlungsinduzierte Sekundärmalignome einhergehen (Hall EJ et Wu CS, 2003).



**Abbildung 2.1 Einfluss neuer Bestrahlungstechniken in der Radioonkologie**

Die Dosisverteilung der dreidimensionalen konventionellen Strahlentherapie (3D-CRT) ist derjenigen der Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT, rechts) für die Bestrahlung eines Meningeoms gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Konformität durch die IMRT deutlich verbessert ist und viel weniger gesundes Gewebe mit einer hohen Dosis bestrahlt wird. Gleichzeitig wird jedoch insgesamt mehr gesundes Gewebe mit einer niedrigen Dosis (blau im Bild) bestrahlt (Abbildung nach Thorp NJ et Taylor RE, 2014).

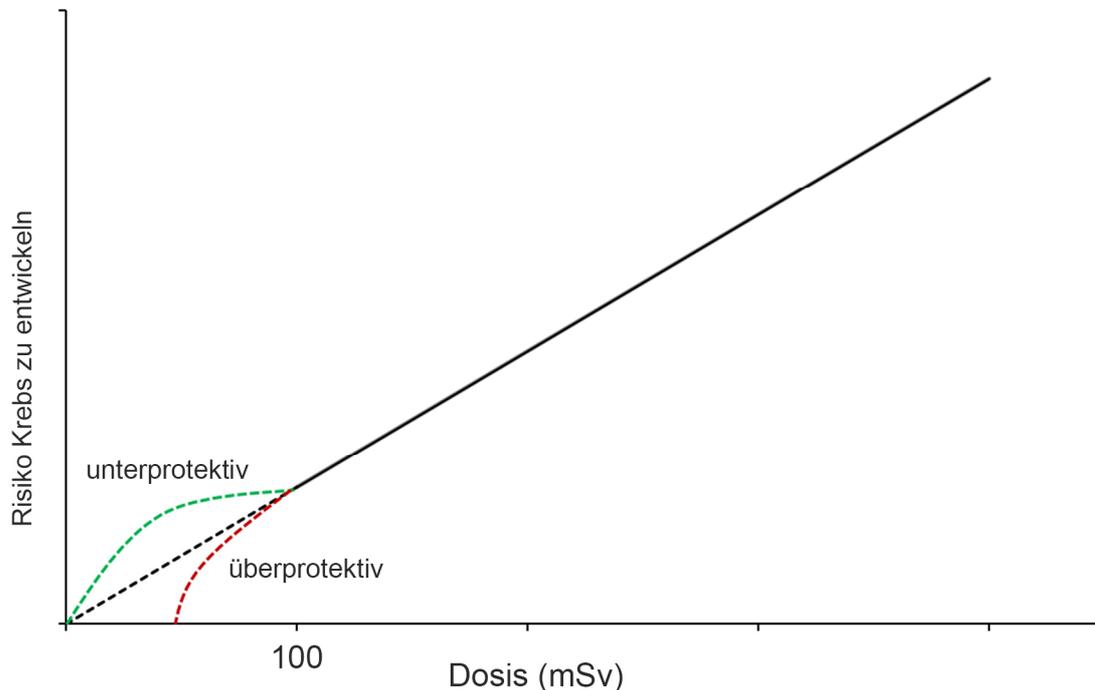
### 2.1.4 Strahlentherapie der ZNS-Tumore im Kindesalter heute

Ein Patient wird heute üblicherweise mit einer Bestrahlung, die auf 20-33 Fraktionen aufgeteilt ist, über einen Zeitraum von 4-6,5 Wochen behandelt. Der typische Dosisbereich für Hirntumore im Kindesalter liegt zwischen 36 Gy und 60 Gy (Bindra RS et Wolden SL, 2016). Bei Medulloblastomen und anderen embryonalen ZNS-Tumoren spielt weiterhin die kraniospinale Bestrahlung gefolgt von einer lokalen Boost-Bestrahlung am Ort der Erkrankung eine wichtige Rolle. Dagegen kann die Bestrahlung (nach Operation) bei nicht-metastasierten Ependymomen, high-grad Gliomen und Kraniopharyngeomen auf das Tumorbett beschränkt werden (Thorp NJ et Taylor RE, 2014). Bei ZNS-Tumoren ist im Mittel mit einem Langzeitüberleben von 71 % zu rechnen (Kaatsch P et Spix C, 2015), was die Notwendigkeit Langzeitfolgen zu verringern unterstreicht.

## 2.2 Das Linear Non-Threshold Modell

Das Linear Non-Threshold (LNT) Modell basiert auf der Hypothese, dass bei niedrigen Strahlendosen das resultierende Risiko für Krebs und/oder vererbte Erkrankungen linear proportional mit zunehmender Dosis steigt (s. Abbildung 2.2). Eine sichere Schwellendosis, unter der kein Risiko besteht, existiert folglich nicht. Die Empfehlungen der Internationalen Strahlenschutzkommission (International Commission on Radiological Protection, ICRP) beruhen auf dem LNT Modell. Sie bilden weltweit die Grundlage von Gesetzen, Normen und Regelungen des Strahlenschutzes (ICRP, 2007; ICRP, 2016; Sanders CL, 2009). Im Wesentlichen beruht das Modell auf den Daten der Life Span Study (LSS) der Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki, die höheren Dosen ausgesetzt

waren als diejenigen, die in der vorliegenden Arbeit von Interesse sind (Mattsson S et Nilsson M, 2015; Tomita M et Maeda M, 2015). Der aktuelle Bericht der LSS zeigt, dass das Risiko für die Entstehung solider Tumoren mit zunehmender Dosis linear wächst. Eine sichere Schwellendosis existiert der Studie zufolge nicht. Bei jungen Menschen war das Risiko höher als bei den älteren (Ozasa K et al., 2012). Während die Datenlage nach einer kurzzeitigen Strahlenexposition dank den Erkenntnissen der LSS gut ist, sind die Risiken zeitlich protrahierter Bestrahlung im Niedrigdosisbereich nicht eindeutig geklärt (Boice JD Jr, 2012). Erschwerend kommt hinzu, dass das resultierende Risiko einer Einzeldosis von 100 mGy oder weniger zu gering ist, um sicher aus epidemiologischen Daten vorhergesagt werden zu können (ICRP, 2016; Tomita M et Maeda M, 2015). Die Risikoabschätzung durch das LNT Modell beruht folglich auf einer Extrapolation des Risikos aus höheren Dosisbereichen (ICRP, 2007; ICRP, 2016; Mattsson S et Nilsson M, 2015; Tomita M et Maeda M, 2015). Auch weitere wissenschaftliche Erkenntnisse deuten an, dass die Berechnung des Risikos für Krebs und anderer vererbbarer Erkrankungen allein aufgrund der Strahlendosis im Niedrigdosisbereich nicht aussagekräftig genug ist. Kritiker des LNT Modells verweisen dabei auf biologische Anpassungsvorgänge und die mögliche Reparatur strahlungsbedingter Schäden in diesem Dosisbereich (Calabrese EJ et O'Connor MK, 2014; Sanders CL, 2009). Ein Ansatz der ICRP, die Risikoabschätzung durch das LNT Modell an den Niedrigdosisbereich anzupassen, ist ein Dosis-Dosisraten-Effektivitätsfaktor von 2. Demnach nimmt die ICRP an, dass das Risiko pro Gy einer niedrigen Dosis im Vergleich zu jenem einer hohen Dosis um diesen Faktor verringert ist. Die ICRP hebt hervor, dass weitere Erkenntnisse über die Strahlenwirkung auf die DNA entscheidend zur besseren Einschätzung des Risikos beitragen können (ICRP, 2007).



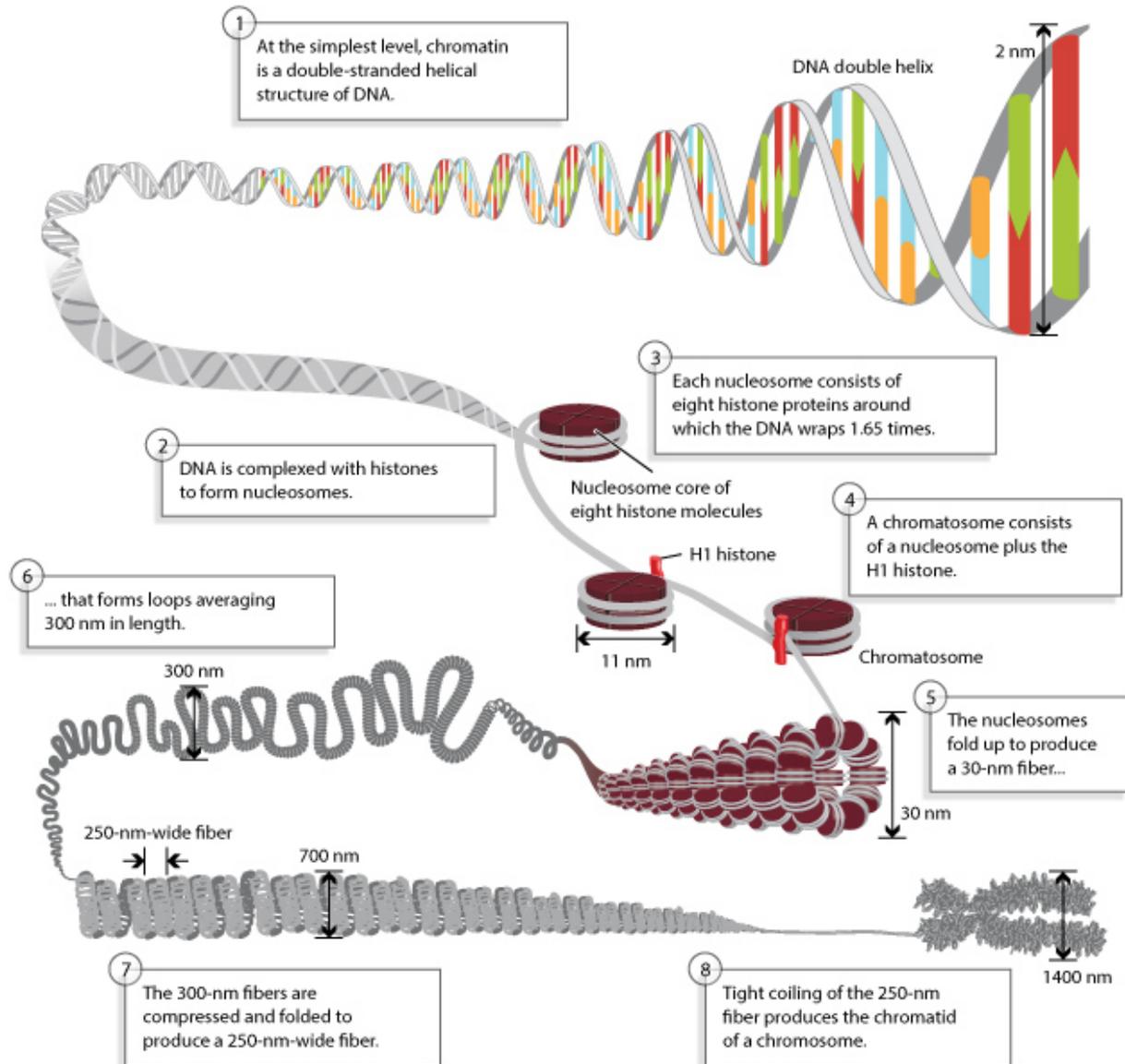
### Abbildung 2.2 LNT Modell und mögliche Beziehung von Strahlungsdosis zu Krebsrisiko

Epidemiologische Daten ermöglichen eine direkte Abschätzung des Krebsrisikos ab 100 mGy (schwarze durchgehende Linie). Die Bewertung des Bereichs unterhalb dieser Dosis erfolgt oftmals durch eine lineare Extrapolation ohne Schwellendosis (schwarze gestrichelte Linie). Es existieren nach Mullenders L et al. jedoch Forschungsergebnisse, die nahe legen, dass diese Annahme das Risiko über- (rote gestrichelte Linie) oder auch unterschätzt (grüne gestrichelte Linie) (Modifizierte Abbildung nach Mullenders L et al., 2009).

## 2.3 DNA-Doppelstrangbrüche

### 2.3.1 DNA und Chromatin

Die DNA (s. Abbildung 2.3) ist der Träger der genetischen Erbinformation (Avery OT et al., 1944). Ihre Information ist in der Basensequenz kodiert. Sie hat die Struktur zweier helikaler Stränge, die sich um eine gemeinsame Achse winden. Die Basen der Stränge zeigen nach innen, die Phosphatreste sind nach außen rotiert. Beide Stränge lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen der Basen zusammen. Es paaren sich spezifisch die Basen Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Aus der Abfolge der Basen des einen Stranges ergibt sich diejenige des anderen (Löffler G et al., 2006; Watson JD et Crick FH, 1953).



**Abbildung 2.3 DNA und Chromatin**

Die DNA innerhalb des Zellkerns wird mithilfe der Histone verpackt. Nucleosomen entstehen als strukturelle Untereinheit bestehend aus acht Histonproteinen, um welche die DNA 1,65-fach gewickelt ist. Durch Zusammenlagern bilden die Nucleosomen eine 30 nm dicke Faser. Weitere Verpackungsschritte können folgen (Abbildung nach Annunziato AT, 2008).

Das Chromatin besteht aus den Histonproteinen und der DNA (Kornberg RD, 1974). Diese ist im Chromatin in einer Reihe von Nucleosomen organisiert. Sie bestehen aus dem Nucleosomenkern, der Linker-DNA und dem Histon H1. Ein Nucleosomenkern ist aus je zwei Histonproteinen, H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut und von einem 145-147 Basenpaare langen Stück DNA umwickelt. Die Nucleosomen lagern sich überdies zu höher geordneten Strukturen, stabilisiert durch das Linker-Histon H1, zusammen. Dadurch wird die DNA um den Faktor 30-40 verdichtet. Das Nucleosom ist das wesentliche Verpackungselement innerhalb des Zellkerns und dadurch der entscheidende Faktor für die Zugänglichkeit der

DNA (Luger K et al., 1997). Abhängig vom Grad der Verpackung kann dicht verpacktes transkriptionell inaktives Heterochromatin von locker verpacktem transkriptionell aktivem Euchromatin unterschieden werden (Löffler G et al., 2006). Die Chromatinstruktur wird durch die posttranslationalen Histonmodifikationen Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung und Sumoylation reguliert (Venkatesh S et Workman JL, 2015).

### 2.3.2 Entstehung von Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, wenn beide Stränge der DNA gleichzeitig und in räumlicher Nähe unterbrochen werden (Doppelstrangbruch, DSB). Sie treten physiologisch auch ohne exogene Einflussfaktoren auf (Cannan WJ et Pederson DS, 2016). Ionisierende Strahlung stellt, neben Chemotherapeutika (Nowosielska A et Marinus MG, 2005), eine Ursache für exogen erzeugte DSBs dar. Die Induktion der DSBs steigt linear mit der Strahlendosis an (Asaithamby A et Chen DJ 2009; Rothkamm K et Löbrich M, 2003). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Photonenstrahlung zählt zur ionisierenden Strahlung. Das heißt, ihre Energie ist hoch genug, um Elektronen aus Atomen zu entfernen. Dadurch kann sie kovalente Bindungen trennen und reaktive Sauerstoffspezies erzeugen (Cannan WJ et Pederson DS, 2016). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Strahlungsart kann somit einerseits direkt mit der DNA wechselwirken. Der überwiegende Teil ihrer Wirkung wird jedoch durch die Radiolyse des die DNA umgebenden Wassers und die daraus resultierenden Reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt (Barcellos-Hoff MH et al., 2005; Cannan WJ et Pederson DS, 2016; Wannemacher M et al., 2013). Diese können durch weitere strahlenchemische Reaktionen Molekülbindungen der DNA und anderer Makromoleküle (Proteine, Lipide) verändern (Wannemacher M et al., 2013):

Die Energieabgabe der Strahlung an die Materie wird durch die Energiedosis (Einheit: Gray) beschrieben:

$$\frac{\text{Energie der zugeführten Strahlung (Joule)}}{\text{Masse des Körpers (Kilogramm)}}$$

(Wannemacher M et al., 2013)

1 Gy Photonenstrahlung erzeugt folgende Läsionen (s. Tabelle 2.1):

**Tabelle 2.1 Zelluläre DNA-Schäden nach 1 Gy Photonenstrahlung**

Typ des Strahlenschadens	Anzahl / (Zelle und Gy)
Doppelstrangbrüche	40
Einzelstrangbrüche	500-1000
Basenschäden	1000-2000
Zuckerschäden	800-1600
DNA-DNA-Crosslinks	30
DNA-Protein-Crosslinks	150

(Goodhead DT, 1994; Wannemacher M et al., 2013)

### 2.3.3 Bedeutung von DNA-Doppelstrangbrüchen

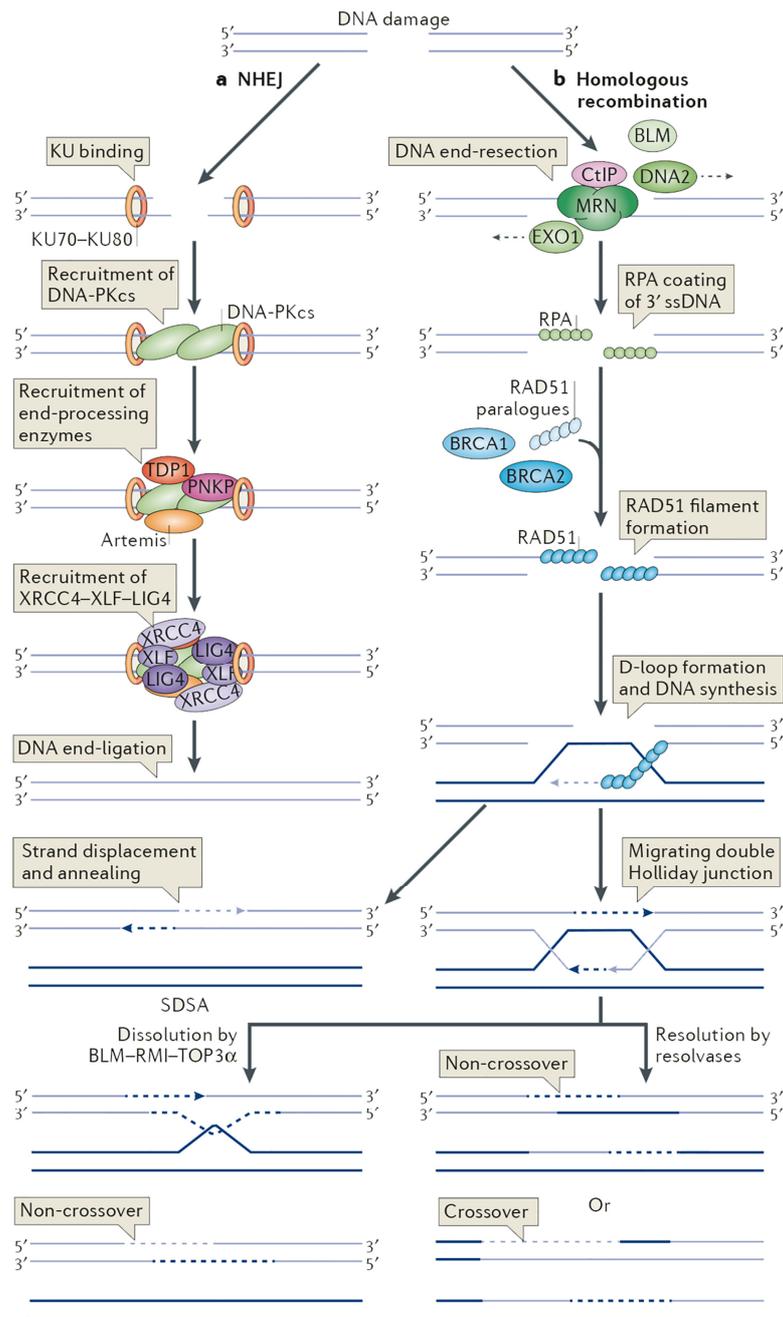
DSBs sind für die Zelle problematischer als andere Schäden an der DNA, da beide Stränge gleichzeitig betroffen sind. Das heißt, zum einen müssen die richtigen Enden einander zugeordnet werden. Bei einem Fehler können Translokationen entstehen. Zum anderen muss eine Reparatur je nach Zellzyklusphase mitunter ohne Vorlage erfolgen, was zu einer fehlerhaften Reparatur führen und damit Mutationen erzeugen kann. Translokationen und Mutationen sind eng mit der Entstehung von Krebs assoziiert (Hoeijmakers JH, 2001). DNA DSBs werden demnach als entscheidende Läsion radiobiologischer Effekte betrachtet (Goodhead DT, 1994). Erkrankungen, die auf Defekten bei der Reparatur der DSBs beruhen, führen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und begünstigen die Entstehung von Krebs (Hoeijmakers JH, 2001).

### 2.3.4 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Neuronen

Die Vielzahl an möglichen Schäden an der DNA führte evolutionär zur Entwicklung von Reparaturwegen, um die in der DNA gespeicherte Erbinformation erhalten zu können (Hoeijmakers JH, 2001). In der vorliegenden Arbeit werden die nicht-proliferierenden ausgereiften Neurone juveniler Mäuse untersucht. Sie nutzen das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ, s. Abbildung 2.4) zur Reparatur von DSBs (Ren K et Peña de Ortiz S, 2002; Sharma S, 2007; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006).

Das NHEJ beinhaltet drei wesentliche Schritte: (I) Erkennen der aus den DSB entstandenen DNA-Enden durch die Ku Proteine, (II) Aufarbeiten der DNA-Enden, um ihre Ligation zu ermöglichen, (III) Verbinden der Enden durch die DNA-Ligase IV (Williams GJ et al., 2014).

Mit dem Binden der Ku Heterodimere an die Bruchenden wird das NHEJ eingeleitet. Gebunden an die DNA schützt Ku deren Enden vor der Verdauung durch zelluläre Nukleasen. Es ergänzt die DNA-Protein Kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), wodurch der DNA-PK Komplex entsteht. Er aktiviert die Kinase DNA-PK (Kakarougkas A et al., 2014) und hält die Enden des DSBs in unmittelbarer Nähe zueinander (Mahaney BL et al., 2009). Die DNA-PK reguliert das Aufbereiten der DNA-Enden und erleichtert die Anlagerung des Ligationskomplexes (bestehend aus der DNA-Ligase IV, dem X-Ray Cross Complementing Protein 4 (XRCC4) und dem XRCC4-like-Faktor). Weitere Proteine tragen zum Aufbereiten der Enden bei (Kakarougkas A et al., 2014). Durch das Aufarbeiten der Enden zum Zwecke der Ligation können Mutationen entstehen, da es ohne eine Vorlage stattfindet (Mahaney BL et al., 2009) und oft fehlerhaft ist (Mahaney BL et al., 2009; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006).



**Abbildung 2.4 DNA- Reparaturwege**

Skizziert ist der Ablauf der beiden Hauptreparaturwege in eukaryotischen Zellen – das Non-homologous endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Das klassische NHEJ beginnt mit dem Binden der Ku Heterodimere an die DNA Enden. Danach lagert sich die DNA-PKcs an. Sie hält die Enden nahe beieinander und sorgt für die Anlagerung von DNA-Enden-prozessierenden Faktoren. Diese bereiten die Enden auf die Ligation durch den (XRCC4) – XRCC4-like factor (XLF) – DNA ligase 4 (LIG4)-Komplex vor. Während das NHEJ in allen Zellzyklusphasen stattfindet, ist die HR auf die S und G2 Phase beschränkt, wenn die Schwesterchromatiden als Reparaturvorlagen verfügbar sind. Es beginnt mit der Erzeugung langer 3' Einzelstrangenden (ssDNA), die durch das replication protein A (RPA) bedeckt werden. Das Protein RAD51 ersetzt RPA an den Enden und bildet ein RAD51-DNA Filament. Dieses sucht nach homologen Sequenzen an anderer Stelle im Genom. Die DNA Synthese beginnt, welche die fehlende DNA um den ursprünglichen Bruch ersetzt. (Abbildung nach Panier S et Boulton SJ, 2013)

### 2.4 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

In der vorliegenden Arbeit werden 53BP1-Foci genutzt, um Anzahl von DSBs zu untersuchen. Foci stellen Ansammlungen oder Modifikationen von Proteinen dar, die als Folge der Bestrahlung an den DSBs entstehen. Sie werden mit (I)RIF ((ionizing) radiation-induced foci) abgekürzt und immunhistochemisch oder mittels Fluorochrom-markierter Proteine nachgewiesen (Rothkamm K et al., 2015).

#### 2.4.1 Historische Entwicklung

Vor der Entdeckung der IRIF basierten die Untersuchungen der Reparatur der DSBs auf Techniken wie der Pulsfeldgelelektrophorese. Deren Sensitivität begrenzte die Untersuchungen auf Bereiche  $\geq 1$  Gy und damit auf höhere Dosen als in der vorliegenden Arbeit von Interesse (Raths A et al., 2008; Whitaker SJ et al., 1991). Es folgte die Entdeckung, dass die Histonvariante H2AX infolge von DSBs phosphoryliert wird ( $\gamma$ H2AX) und sich diese DSBs mittels lichtmikroskopisch nachweisbarer Foci darstellen ließen (Raths A et al., 2008; Rogakou EP et al., 1998; Rogakou EP et al., 1999). Weitere Ergebnisse zeigten, dass DSBs auch durch 53BP1-Foci dargestellt werden können (Schultz LB et al., 2000). Die IRIF erlaubten erstmals die Untersuchung der Entstehung und Reparatur der DSBs einzelner Zellen nach diagnostisch und therapeutisch relevanten Dosen (Raths A et al., 2008).

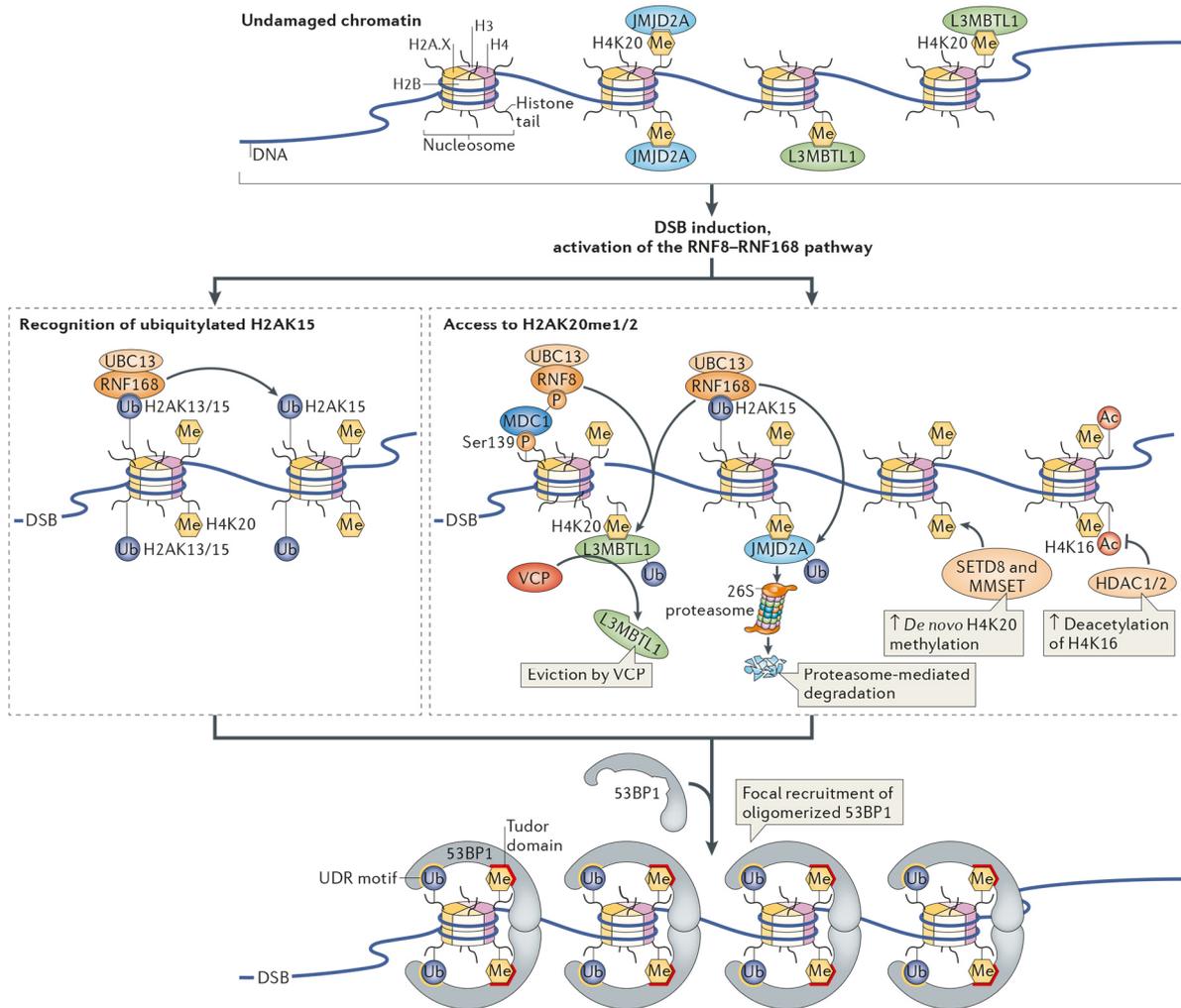
#### 2.4.2 p53-Binding Protein 1

Das p53-Binding Protein 1 (53BP1) wurde durch seine Eigenschaft, an den Tumorsuppressor p53 zu binden, entdeckt (Iwabuchi K et al., 1994). Die Bedeutung der Interaktion zwischen p53 und 53BP1 ist bislang ungeklärt. 53BP1 hat eine zentrale Rolle in der Chromatin-vermittelten DSB-Reparatur. Gebunden an DSBs fördert es die Anlagerung weiterer Proteine der zellulären Schadensantwort und ist an der Zellzykluskontrolle beteiligt. 53BP1 spielt zudem eine Schlüsselrolle in der Wahl des DSB-Reparaturweges (Panier S et Boulton SJ, 2013). Indem es die Resektion an den Enden der Brüche verhindert, sorgt es dafür, dass die Reparatur durch das klassische NHEJ (c-NHEJ) und nicht durch andere Reparaturwege erfolgt (die Homologe Rekombination (HR, ein anderer Hauptreparaturweg der DSBs) oder das a-NHEJ (einem Reparaturweg mit extensivem Aufarbeiten der Enden; Bothmer A et al., 2011; Kakarougkas A et al., 2014; Panier S et Boulton SJ, 2013)). Die Zelle kann durch die Regulation der Anlagerung des 53BP1 an den DSBs die Wahl des Reparaturweges steuern (Panier S et Boulton SJ, 2013). Weiterhin ist 53BP1 entscheidend an der Reparatur von DSBs im Heterochromatin beteiligt. Hierbei vermittelt es die Phosphorylierung des Proteins KAP-1 (KRAB-associated protein 1, einem Heterochromatin begünstigenden Faktor) durch die

Kinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated). Das dicht gepackte Heterochromatin wird aufgelockert und so die Reparatur ermöglicht (Goodarzi AA et al., 2008; Kakaroukas A et al., 2013; Noon AT et al., 2010). Abhängig vom Zellzyklus unterstützt es dadurch die Reparatur von DSBs durch NHEJ (G1) oder HR (G2) (Kakaroukas A et al., 2013; Noon AT et al., 2010). Neurone zeigen eine Zunahme von Heterochromatin und eine Gen-Stillegung, wenn die 53BP1-Akkumulation gestört ist (Baltanás FC et al., 2011).

### 2.4.3 Anlagerung des 53BP1 an DNA-Doppelstrangbrüche

53BP1 ist in unbestrahlten lebenden Zellen gleichmäßig über den Zellkern verteilt (Pryde F et al., 2005). Die Aktivierung der Kinase ATM an DSBs führt zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX ( $\gamma$ H2AX). Konsekutiv lagert sich das Protein MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) an. MDC1 fördert die Anlagerung der Proteine RNF8 (Ring finger protein 8) und RNF 168 (Ring finger protein 168) (Kakaroukas A et al., 2014). RNF168 bindet RNF8-abhängig an mit Ubiquitin markierte Histone H2A in der Nähe der DSBs. Es erhöht die lokale Konzentration des an Lysin63 gebundenen Ubiquitin der Histone H2A und H2AX. Sie ist für die Retention von 53BP1 notwendig (Doil C et al., 2009; Kakaroukas A et al., 2014; Stewart GS et al., 2009). Die Histon-Methyltransferase MMSET (multiple myeloma SET domain-containing protein) trägt  $\gamma$ H2AX-MDC1-abhängig zur Methylierung des Histons H4 und zur konsekutiven Akkumulation von 53BP1 bei (Kakaroukas A et al., 2014; Pei H et al., 2011). 53BP1 bindet an Nukleosomen mit dimethylierten Histonen H4 (H4K20me<sub>2</sub>) und an Lysin 15 ubiquitiniertem Histon H2A (H2AK15ub) (Fradet-Turcotte A et al., 2013; Kakaroukas A et al., 2014). An Stellen aktiver Transkription werden die Histone H4 durch die Acetyltransferase TIP60 acetyliert. Die Acetylierung an Lysin 16 des Histon H4 (H4K16ac) reduziert die Bindung des 53BP1 an H4K20me (Tang J et al., 2013).  $\gamma$ H2AX und 53BP1 können infolge von DNA-Schäden direkt miteinander interagieren (Kleiner RE et al., 2015). Der Ablauf der Anlagerung des 53BP1 ist in Abbildung 2.5 veranschaulicht:



**Abbildung 2.5 Modell der Anlagerung des 53BP1 in DSB Nähe**

Ohne einen DNA-Schaden wird das an Position 20 dimethylierte Lysin der Histone H4 (H4K20me<sub>2</sub>) durch die Proteine L3MTBL1 und JMJD2A (Jumonji domain-containing protein 2A) maskiert. Nach einem DSB und der Aktivierung des ATM Signalwegs, akkumuliert 53BP1 an dem geschädigten Chromatin. Das fokale Anlagern des 53BP1 benötigt die RNF168 vermittelte Ubiquitinierung von H2AK15 (H2AK15ub). Außerdem beruht sie auf einem gesteigerten Zugang des 53BP1 an mono- und besonders dimethyliertes H4K20. Mehrere Mechanismen beeinflussen das Binden von 53BP1 an methyliertes H4K20: **(I)** Chromatin gebundenes RNF8 und RNF168 fördern das Ubiquitin-abhängige Ablösung von L3MTBL1 und JMJD2A vom Chromatin. **(II)** Die Histonmethyltransferasen SETD8 (SET domain-containing protein 8) und MMSET stehen in Diskussion, die lokale Mono- und Dimethylierung von H4K20 zu erhöhen. **(III)** Die Deacetylierung von H4K16 durch die Histondeacetylasen 1 und 2 (HDAC1 und HDAC2) erhöht die Bindungsaffinität des 53BP1 für H4K20me<sub>2</sub> weiter. 53BP1 bindet nur an Nucleosomen, die gleichzeitig an H2AK15 ubiquitiniert und an H4K20 methyliert sind (Abbildung nach Panier S et Boulton SJ, 2013).

### 2.4.4 53BP1-Foci in Neuronen

Bereits in einer Vielzahl vorhergehender Studien wurde 53BP1 genutzt, DSBs zu detektieren und deren Reparatur über die Zeit zu untersuchen (Asaithamby A et Chen DJ 2009; Casafont I et al., 2011; Goodarzi AA et al., 2008; Rube CE et al., 2011; Saha S et al., 2014; Schuler N et Rube CE, 2013). Die bisherigen Erkenntnisse über die Reparatur von DSBs im Niedrigdosisbereich beruhen im Wesentlichen auf Daten adulter Mäuse (Grudzenski S et al., 2010; Rube CE et al., 2011; Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). Es zeigte sich, dass die Anzahl der durch 53BP1-Foci-markierten DSBs in den Neuronen nach einmaliger Bestrahlung zwischen 0,1 Gy und 1 Gy linear mit der Dosis zunimmt (Rube CE et al., 2011). Innerhalb der ersten 30 Minuten post-IR steigt die 53BP1-Focuszahl solange, bis die Detektion der Brüche durch 53BP1 erfolgt ist (Asaithamby A et Chen DJ 2009; Marková E et al., 2007). Danach ist in den Neuronen ein Rückgang der DSBs durch die zugrundeliegende Reparatur zu beobachten (Rube CE et al., 2011; Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014).

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Neurone fraktioniert bestrahlter *adulter* Mäuse (50 × 100 mGy) zeigen, dass 72 h post-IR noch immer eine erhöhte Anzahl der 53BP1-Foci zu finden ist, sie 35 Tage post-IR jedoch wieder das Kontrollniveau erreicht (Schanz S et al., 2012).

Die Ergebnisse der Neurone *juveniler* Mäuse beschränken sich auf einmalig mit 2 Gy bestrahlte. Hervorzuheben ist dabei, dass 0,5 Monate alte Mäuse einen etwa doppelt so schnellen Rückgang der 53BP1 Focuszahl zeigten wie ältere Mäuse (3 Monate und 24 Monate alt), wenngleich 48 h post-IR alle Gruppen mit 15-18% verbleibenden Foci vergleichbare Werte erreichten (Schanz S, 2014).

Daten über die Reparatur der DSBs in Neuronen *juveniler* Mäuse nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung fehlen. Sie sind von besonderem Interesse, da durch den zunehmenden Einsatz hochkonformaler Bestrahlungstechniken in der Behandlung von ZNS-Tumoren im Kindesalter unweigerlich ein größeres Volumen des gesunden Gewebes, wenn auch mit einer geringeren Dosis, bestrahlt wird (Hall EJ et Wu CS, 2003; Thorp NJ et Taylor RE, 2014).

## 3 Fragestellung

Der Einsatz neuer hochkonformaler Bestrahlungstechniken wie der IMRT in der Behandlung kindlicher ZNS-Tumoren gestattet es mit Hilfe von mehr Bestrahlungsfeldern als in früheren Verfahren, das Bestrahlungsvolumen sehr genau an das Zielvolumen anzupassen. Dadurch wird jedoch unweigerlich mehr gesundes Gewebe - wenn auch mit einer niedrigeren Dosis als zuvor - bestrahlt (Hall EJ et Wu CS, 2003). Mit Hilfe des in vivo Modells juveniler Mäuse soll in der vorliegenden Arbeit die Anzahl potentiell persistierender DNA-Doppelstrangbrüche in deren kortikalen Neuronen  $\geq 72$  Stunden nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung erfasst werden. Hierbei dienen 53BP1-Foci als Marker für die DNA-Doppelstrangbrüche. Folgende Fragen werden untersucht:

1. Wie wirkt sich die zunehmende Anzahl an Bestrahlungsfractionen auf die Zahl der 72 Stunden nach Bestrahlung persistierenden DNA-Doppelstrangbrüche aus?
2. Wie entwickelt sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zwischen 72 Stunden und 6 Monate nach vierwöchiger fraktionierter Bestrahlung?

## 4 Material und Methodik

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Antikörper

**Tabelle 4.1 Primärantikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle/Hersteller</b>
Rabbit Anti-53BP1 IHC Antikörper	1:200	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
pAb anti-53BP1	1:5000	Novus Biologicals Europe, Abingdon, OX14 3NB, United Kingdom
Mouse-Anti-NeuN	1:500	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 4.2 Sekundärantikörper**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Quelle/Hersteller</b>
Alexa Flour® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

**4.1.2 Geräte und Messinstrumente**

**Tabelle 4.3 Geräte und Messinstrumente**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quelle/Hersteller</b>
Gewebeeinbettautomat Shandon™ Excelsior™ ES	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454, USA
Kolbenhubpipette Transferpette ® S  0,5-10 µl  20-200 µl  100-1000 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Laborzentrifuge HERAEUS Biofuge Fresco	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Magnetrührer Stuart	VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland
Messzylinder, Sechskantfuß 500 ml hohe Form, braun graduert	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG , Sondheim/ Rhön, Deutschland
Mikroskop Eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Mikroskop Eclipse Ni-E	Nikon, Tokio, Japan
Paraffin-Streckbad TFB 45	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Rotationsmikrotom Leica RM 2235	Nussloch, Deutschland
Vortex-Genie® 2 Laborschüttler	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

### 4.1.3 Reagenzien und Lösungen

**Tabelle 4.4** Verwendete Reagenzien/Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quelle/Hersteller</b>
Eindeckmedium Vectashield® Hard Set™ Mounting Medium With Dapi H-1500	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Narkoselösung : Ketamin 120 µl/ml und Rompun 80 µl/ml in 0,9 % NaCl	s. Quelle/Hersteller Ketamin bzw. Rompun
Paraformaldehydlösung 32 %	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Paraplast® Gewebeeinbettmedium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,2-7,4 (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Apotheke der Universität des Saarlandes, Deutschland
Rompun 2 % Injektionslösung	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Roti®-Immunoblock 10× Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spülpuffer: 10 µl Heparin/1 ml PBS	Für PBS s. Quelle/Hersteller PBS
Target Retrieval Solution (10×)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Ursotamin 100 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Xylol	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland

**4.1.4 Verbrauchsmaterialien**

**Tabelle 4.5** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Quelle/Hersteller</b>
Deckgläser 24 × 60 mm Stärke 1	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Immersionsöl Art.-Nr. 1.04699.0100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mikrotom-Klinge	Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland
Objektträger 76mm × 26 mm × 1mm	Paul Marienfeld & Co KG Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl transparent 200 µl gelb 1000 µl blau	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. , Nümbrecht, Deutschland
PP-Röhrchen 50 ml, 30/115 mm mit Stehrand	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Präzisionswischtücher 11 × 21 cm <sup>2</sup>	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml No. /REF 86.1685.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spüllösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Unsterile Untersuchungshandschuhe aus Nitril Manufix® Free	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

### 4.2 Methodik

#### 4.2.1 Mausstamm und Haltungsbedingungen

Der Mausstamm C57BL/6N Clr von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) wurde verwendet.

Am ersten Tag der Bestrahlung waren die Mäuse sieben Tage alt. Sechs männliche juvenile Mäuse waren jeweils einem Muttertier zugeordnet. Entsprechend wurden für alle sieben Untersuchungszeitpunkte eine Gruppe und eine zugehörige Kontrollgruppe gebildet. Vor der 13. Bestrahlung wurden die verbliebenen juvenilen Mäuse von den Muttertieren getrennt.

Die Versuchstierhaltung fand im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlands statt. Sie erfolgte bei  $55 \pm 10$  % Prozent Luftfeuchtigkeit,  $22 \pm 2$  °C und einem Tag-/ Nachtrhythmus von 12 Stunden zu 12 Stunden. Sowohl die Haltung, als auch die Versuche erfolgten übereinstimmend mit den Vorgaben des Landesamts für Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes und des Tierschutzgesetzes.

#### 4.2.2 Bestrahlung der Versuchstiere

##### 4.2.2.1 Bestrahlungsparameter

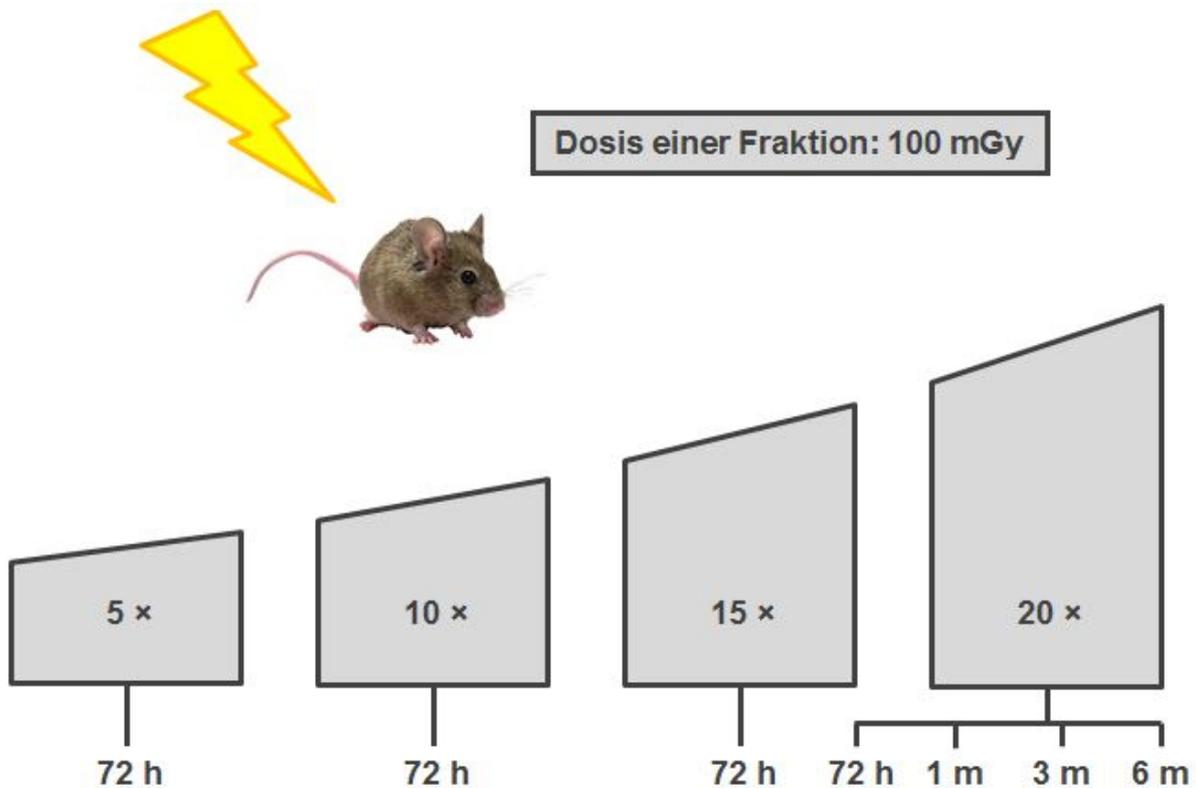
Als Strahlungsquelle diente ein Linearbeschleuniger (Artiste bzw. Oncor, Siemens) mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min und einer Beschleunigungsspannung von 6 Megavolt. Es wurde ein senkrechtes rechteckiges Strahlenfeld (Gantrywinkel 0°, Kollimatorwinkel 0°, 30 cm × 30 cm) generiert. Der Quellen-Haut-Abstand betrug 2 Meter.

Alle juvenilen Mäuse eines Muttertiers befanden sich während der Bestrahlung gleichzeitig in einem Plexiglaszylinder. Er hatte einen Innendurchmesser von 19 cm, eine Höhe von 25 cm und seine Plexiglasstärke war 4 mm. Die Bodenplatte des Plexiglaszylinders hatte eine Grundfläche mit 20 cm × 24,8 cm Kantenlänge. Eine kreisrunde 1,5 cm dicke Plexiglasscheibe mit Abstandshaltern engte den Bewegungsspielraum auf 5 cm in der Höhe ein und sorgte für eine homogene Dosisverteilung. Der Zylinder wurde unter Laserkontrolle reproduzierbar mittig im Strahlenfeld platziert.

##### 4.2.2.2 Bestrahlungsplan und Zeitpunkt der Gewebeentnahme

Die juvenilen Mäuse wurden an fünf aufeinander folgenden Wochentagen (Montag-Freitag) einmal täglich im Abstand von 24 Stunden bestrahlt. Sie wurden unmittelbar vor der Bestrahlung und für deren Dauer von den Muttertieren getrennt. Zwei bestrahlungsfreie Tage folgten. Je eine Gruppe aus 6 juvenilen Mäusen wurde eine, zwei, drei und vier Wochen derartig bestrahlt. Die Gewebeentnahme erfolgte jeweils 72 Stunden nach der letzten

Bestrahlung. Hierdurch sollten die Auswirkung einer zunehmenden Anzahl an Fraktionen und der resultierenden Gesamtdosis auf die potentiellen DNA Schäden erfasst werden. Die Persistenz von DNA Schäden nach Bestrahlung wurde untersucht, indem die Gewebe 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der vierwöchigen Bestrahlung entnommen wurden.



**Abbildung 4.1 Bestrahlungsplan**

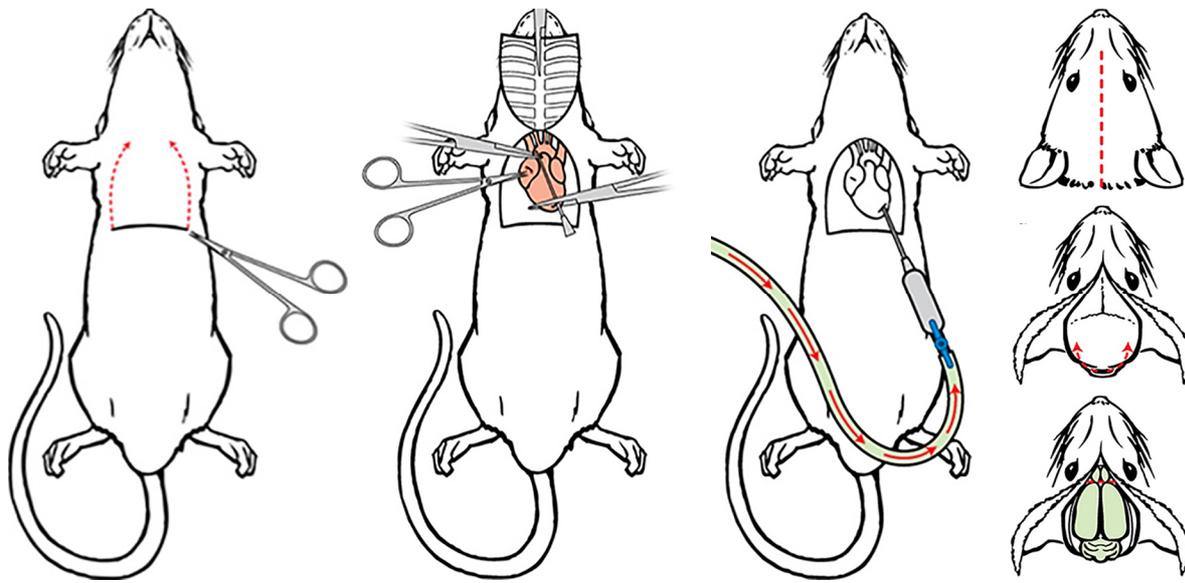
Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 100 mGy pro Fraktion. Grau dargestellt ist die Anzahl der Fraktionen während des vierwöchigen Bestrahlungszeitraums (5×-20×). Darunter angegeben ist die zugehörige Zeit zwischen der letzten Bestrahlung und der Probenentnahme (72 Stunden bis 6 Monate).

### 4.2.3 Gewebeentnahme und -Aufarbeitung

#### 4.2.3.1 Intrakardiale Perfusion, Gewebeentnahme und Formalinfixation

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion (Ketamin 120 µg/g Körpergewicht (KG), Rompun 16 µg/g KG) betäubt. Der Wirkeintritt wurde abgewartet. Es wurde erst fortgefahren, wenn die Mäuse beidseits sicher nicht mehr auf Schmerzreize reagiert hatten. Anschließend wurden sie in Rückenlage an ihren abgespreizten Extremitäten fixiert. Das Fell wurde mit Ethanol angefeuchtet bis es der Bauch-/Thoraxwand anlag und mit der Haut entfernt. Der Thorax und das Abdomen wurden eröffnet, das schlagende Herz freigelegt und in den linken Ventrikel 1 µl Heparin/(g KG) gespritzt. Eine Flügelkanüle wurde in den linken Ventrikel eingebracht und begonnen den Spülpuffer (10 µl Heparin/1 ml PBS (phosphate buffered saline)) zu injizieren. Zeitgleich wurde das rechte Atrium eröffnet. Der Spülpuffer

wurde solange infundiert bis sich die Leber von ihrer dunkelroten Farbe ausgehend nicht weiter in ein leichtes Braun entfärbte. Daraufhin wurde die Paraformaldehydinfusion gestartet. Kriterien für eine gelungene Fixation waren ein steifer Nacken und ein starrer Schwanz der Mäuse. Die Schädeldecke wurde nach der Entnahme des Herzens, des Hodens und der Lunge eröffnet und das Gehirn entnommen. Dieses wurde im Bereich der Seitenventrikel frontal in zwei Teile getrennt.



**Abbildung 4.2 Perfusion**

Dargestellt ist der schematische Ablauf der Perfusion. Die anästhesierten Mäuse wurden in Rückenlage fixiert. Abweichend von der vorliegenden Darstellung wurde das Abdomen zur Entnahme weiterer Organe ebenfalls eröffnet. Bei schlagendem Herzen wurde in den linken Ventrikel die Infusionsnadel eingebracht. Das rechte Atrium wurde eröffnet. Nach erfolgter Perfusion konnte die Schädeldecke eröffnet und das Gehirn entnommen werden (Abbildung modifiziert nach Gage GJ et al., 2012).

### 4.2.3.2 Paraffineinbettung

Die entnommene Gehirne wurden in 4-% normalgepufferter Formalinlösung (pH = 7,4) sofort für mindestens 16 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Im nächsten Schritt wurden sie in PBS gewaschen, um überschüssige Fixierlösung zu entfernen. Dann wurden sie mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Hierbei wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 Vol.-%, 70 Vol.-%, 80 Vol.-%, 2 × 99,98 Vol.-%) jeweils 65 Minuten entwässert. Daraufhin wurden sie zweimal 55 Minuten und einmal 80 Minuten in Xylol gelagert. Es folgte die zweimalig 60-minütige und einmalig 80 Minuten dauernde Paraffineinbettung. Abschließend wurden die Gewebe mit Hilfe von Ausgießformen in Paraffinblöcke gegossen.

### 4.2.3.3 Erstellen der Gewebeschnitte

Die in Paraffinblöcke gegossenen Gewebe wurden vor dem Schneiden auf -20 °C gekühlt. Mit dem Mikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte erzeugt. Infolgedessen schwammen diese auf destilliertem und Raumtemperatur warmem Wasser. Sie wurden auf einen Objektträger überführt und in 50-52 °C warmem Wasser erneut aufschwimmen gelassen. Sobald dadurch die durch das Schneiden entstandenen Falten geglättet waren, konnten die Schnitte auf dem Objektträger repositioniert werden. Der Trockenvorgang erfolgte über 16 Stunden bei 37 °C oder 1 Stunde bei 56 °C. Bis zur Färbung wurden die Objektträger bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert.

### 4.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden in Xylol durch dreimaliges, jeweils sieben Minuten andauerndes Einwirken entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe (99,9 %-Vol., 96 %-Vol., 90 %-Vol., 80 %-Vol. und 70 %-Vol.) erfolgte die Rehydrierung. Danach wurden die Objektträger in destilliertem Wasser zwischengelagert bis sie in 300 ml kochenden Citratpuffer überführt werden konnten. Darin kochten sie eine Stunde bei 95 °C. Das citratpufferhaltige Gefäß wurde aus dem Wasserbad genommen und kühlte bei Raumtemperatur 20 Minuten ab.

Jeder Objektträger wurde mit jeweils 200 µl Immunoblocklösung überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. In einer Feuchtkammer lagerten die Objektträger im Dunkeln eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Deckgläser wurden entfernt und die Immunoblocklösung kurz abfließen gelassen. Pro Objektträger wurden 200 µl der Primärantikörperlösung aufgetragen. Bei 4 °C und Dunkelheit in der Feuchtkammer wirkte sie mindestens 16 Stunden ein. Nach dem Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger dreimal 10 Minuten in PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden parallel in Immunoblocklösung verdünnt und die entstandene Lösung wurde drei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Je Objektträger wurden 200 µl der Sekundärantikörperlösung aufgebracht. Unter einem neuen Deckglas wirkte sie eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit in der Feuchtkammer ein. Die Deckgläser wurden entfernt, die Objektträger dreimal je 10 Minuten in PBS gewaschen und mit Präzisionswischtüchern vorsichtig getrocknet. Mit dem DAPI-haltigen Eindeckmedium und einem neuem Deckglas versehen, lagerten die Proben bis zur Auswertung mindestens 16 Stunden bei 4 °C.

**Tabelle 4.6 Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe**

	<b>DAPI-dsDNA</b>	<b>Alexa Fluor 488</b>	<b>Alexa Fluor 568</b>
maximale Exzitation	363 nm***	494 nm*	578 nm*
maximale Emission	448 nm***	517nm*	603 nm*
Farbe	Blau**	Grün*	Rot*

\*\*\*(Kapuscinski J, 1995); \*\*(Torres G et al., 2015); \*(Buchwalow IB et Böcker W, 2010)

**Tabelle 4.7 Verwendete Fluoreszenzfilter**

	<b>DAPI</b>	<b>FITC</b>	<b>Texas Red</b>
Anregungsfilter	340-380 nm	465-495 nm	540-580 nm
Dichroitischer Strahlenteiler	400 nm	505 nm	595 nm
Emissionsfilter	435-485 nm	515-555 nm	600-660 nm

(Angaben laut Kennzeichnung der Filter/Aufschrift des Mikroskops)

#### **4.2.3.5 Mikroskopische Auswertung und Dokumentation**

Das Mikroskop Nikon Eclipse E600 wurde zum Auszählen der Foci verwendet. Als Lichtquelle diente die Quecksilberhochdrucklampe CSHG-1 von Nikon. Die Auswertung fand direkt mit dem Auge bei 600-facher Vergrößerung (60× Objektiv) statt. Dabei wurde Immersionsöl verwendet. Zur besseren Übersicht wurde das Sichtfeld auf eine überschaubare Zellzahl eingengt. Alle Zellkerne der Neurone wurden in jeder ihrer Ebenen durch Fokussieren dargestellt, um mögliche Foci innerhalb der dreidimensionalen Kerne erfassen zu können. Die Anzahl der Foci und der Neurone pro Gesichtsfeld wurde aufsummiert. Pro Probe wurden mindestens 40 Foci und 40 Neurone ausgezählt. Neben der Anzahl der Foci in Bezug auf die gesamte Zellzahl wurde auch deren quantitative Verteilung auf die einzelnen Focus tragenden Nuklei bestimmt. Dadurch sollte nachvollziehbar bleiben, wie sich die Verteilung der Foci auf die Zellen bei einer Änderung der Focuszahl verhält. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Eclipse Ni-E bei 600-facher Vergrößerung (60× Objektiv). Die Bilderverarbeitung fand mit Adobe Photoshop statt.

#### **4.2.4 Datenerfassung - Statistische Auswertung**

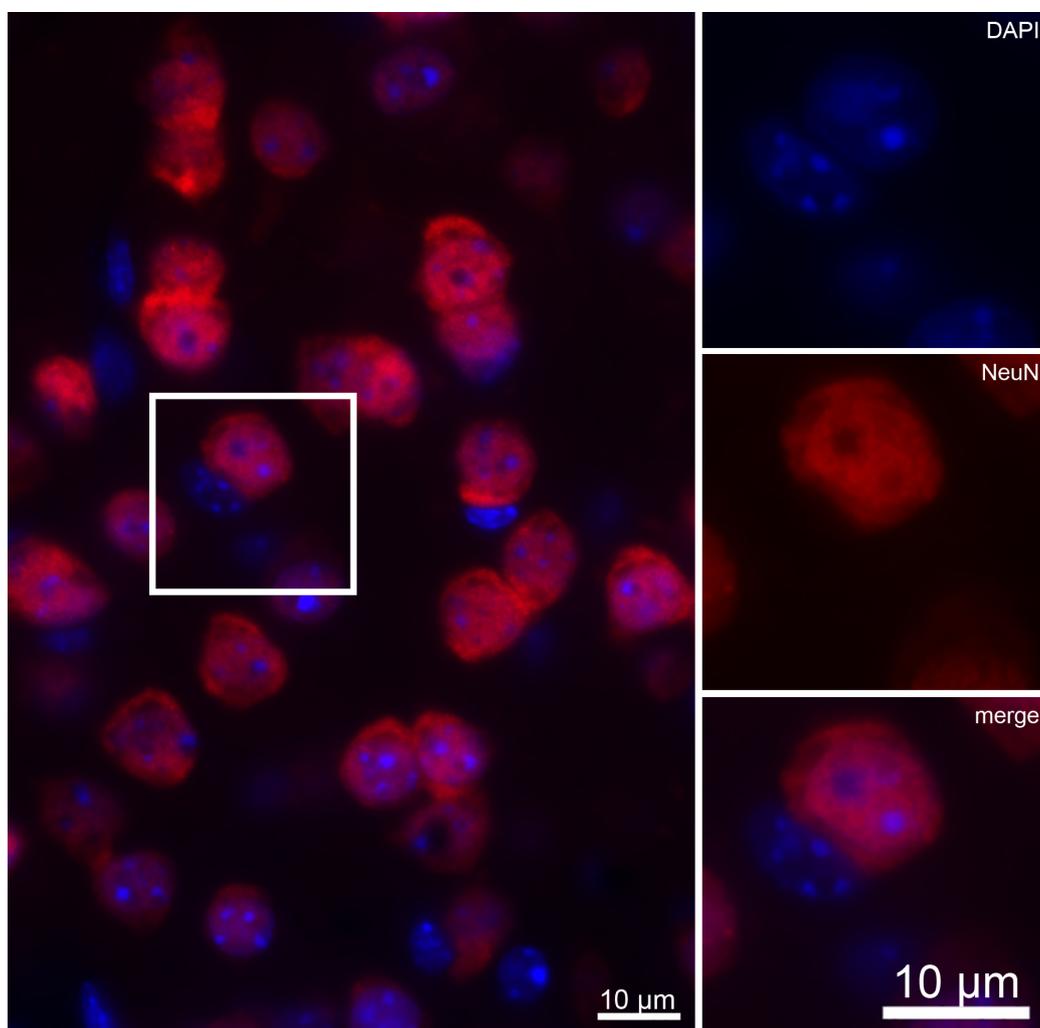
Microsoft Excel diente der Datenerfassung. Weitere statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 23. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bewertet, wobei ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  gewählt wurde. Eine Regressionsanalyse wurde unter der Fragestellung eines linearen Zusammenhangs zwischen der applizierten Dosis und der Focuszahl/Neuron durchgeführt. Mit einer Korrelationsanalyse wurde der Zusammenhang

zwischen Focuzahl/Neuron und dem Anteil der Neurone mit einem Focus untersucht. Diagramme wurden mit Origin Pro 2016G erzeugt.

## 5 Ergebnisse

Mit Hilfe strahlungsinduzierter 53BP1-Foci wurde die Anzahl von DNA-Schäden in den kortikalen Neuronen infolge fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung im *in vivo* Modell juveniler Mäuse untersucht. Die Neuronen wurden mit Antikörpern gegen NeuN dargestellt (s. Abbildung 5.1). Durch die Auswertung der 53BP1-Foci in den Neuronen wurde die zunehmende Akkumulation der DNA Schäden durch die fraktionierte Bestrahlung über vier Wochen analysiert (s. 5.3.1 und 5.4.1). Ihre Langzeitentwicklung wurde bis zu einem halben Jahr nach der Bestrahlung erfasst (s. 5.3.2 und 5.4.2).

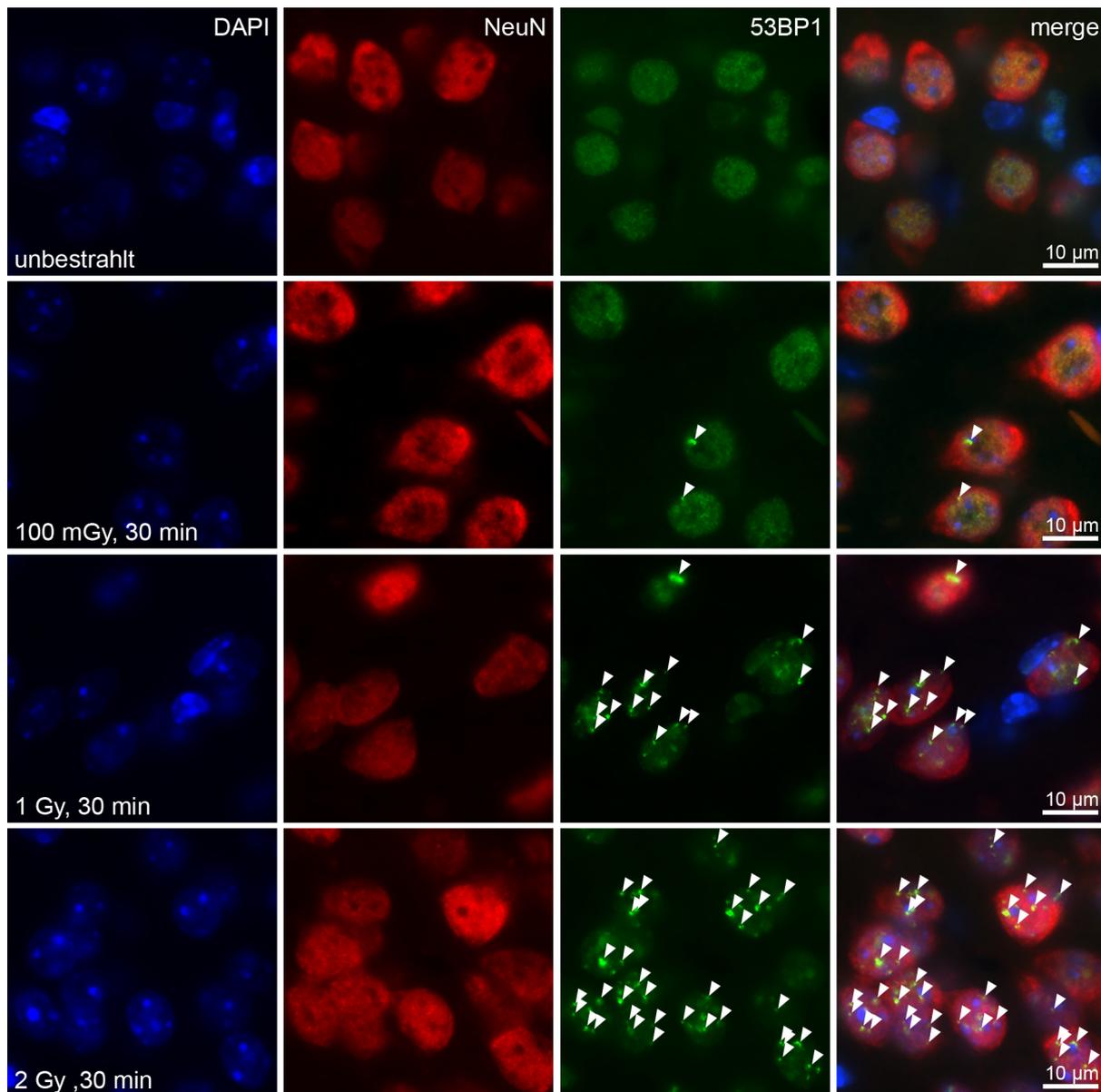
### 5.1 Darstellung der kortikalen Neuronen



**Abbildung 5.1 Darstellung der kortikalen Neuronen**

Zerebraler Kortex einer 14 Tage alten Maus. Die fluorezenzmikroskopische Darstellung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau), die Markierung der kortikalen Neurone erfolgte mit NeuN (rot). Der im Übersichtsbild (links) weiß umschriebene Ausschnitt ist in der rechten Spalte sowohl aufgetrennt nach Kanälen – oben DAPI (blau), Mitte NeuN (rot) – als auch überlagert (merge) abgebildet. Es wird deutlich, dass nur ein Teil der Zellen mit dem neuronalen Marker NeuN markiert ist.

## 5.2 Darstellbarkeit strahlungsinduzierter Foci



**Abbildung 5.2 53BP1-Focuszahl – Zunahme mit steigender Dosis**

Entwicklung strahlungsinduzierter 53BP1-Foci 30 Minuten nach Bestrahlung. Die Bilder sind nach steigender Dosis angeordnet (oben: Kontrolle – unten:  $1 \times 2$  Gy). In den Zeilen ist jeweils derselbe Bildausschnitt aufgetrennt nach Fluoreszenzkanälen (blau: DAPI, rot: NeuN, grün: 53BP1) und überlagert (merge) abgebildet. An dieser Stelle wird die Fähigkeit der Methode gezeigt, eine steigende Strahlungs-dosis durch eine Erhöhung der Focuszahl darzustellen. 53BP1-Foci sind markiert (weiße Pfeile), wenn dadurch keine anderen Foci verdeckt werden. Es ist zu erkennen, dass 53BP1 über die Zellkerne der Neurone verteilt ist.

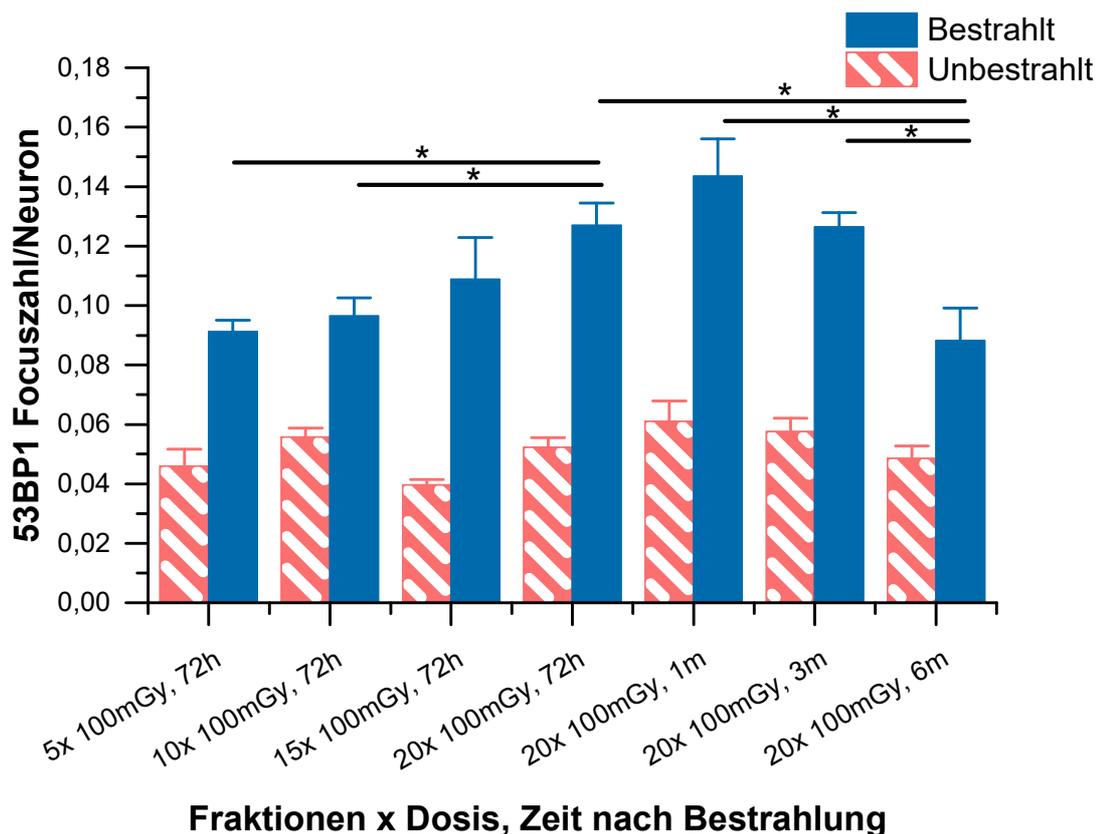
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deckten mittels der Auswertung mehrerer hundert Neurone eine Änderung der 53BP1-Focuszahl durch Bestrahlung auf (s. 5.3.1). In Aufnahmen, die eine Darstellung der Foci erlauben, können nur wenige Neurone erfasst werden. Zudem war die Focuszahl/Neuron in der vorliegenden Arbeit so gering, dass vorhandene Unterschiede in den Aufnahmen nicht visualisierbar waren (s. Abbildung 5.5).

Deshalb wurden Proben vorangegangener Untersuchungen herangezogen, die im gleichen Dosisbereich bestrahlt, jedoch bereits kurz nach Bestrahlung (30 min) gewonnen worden waren. Abbildung 5.2 zeigt, dass die in dieser Arbeit angewandte Methode in der Lage ist, eine entsprechend starke Änderung der 53BP1-Focuszahl darzustellen.

### 5.3 53BP1-Foci in fraktioniert bestrahlten und unbestrahlten kortikalen Neuronen

#### 5.3.1 Einfluss zunehmend fraktionierter Bestrahlung auf die Focuszahl/Neuron

Der Einfluss der zunehmenden fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung auf die Akkumulation von DNA-Schäden wurde in den kortikalen Neuronen juveniler Mäuse durch die Bestimmung der 53BP1-Focuszahl untersucht. Über den Zeitraum von bis zu vier Wochen wurden die Mäuse mit je fünf Fraktionen pro Woche bestrahlt. 72h nach der letzten Bestrahlung fand eine Quantifizierung der Foci statt (s. 4.2.2.2).



**Abbildung 5.3 53BP1-Focuszahl in den kortikalen Neuronen juveniler Mäuse**

Aufgetragen ist die Focuszahl/Neuron (vertikale Achse) der juvenilen Mäuse nach unterschiedlicher Anzahl von Fraktionen bzw. nach der Zeit nach der Bestrahlung (horizontale Achse). Die Balken stellen die Mittelwerte der Focuszahl/Neuron in der bestrahlten Mäusen (blau) und ihren unbestrahlten Kontrollen (rot) dar. Fehlerbalken entsprechen dem zugehörigen Standardfehler. Mittelwert und Standardfehler beruhen auf fünf Mäusen je Zeitpunkt. Die ersten vier Gruppen wurden jeweils 72 Stunden post-IR ausgewertet. Sie waren einer steigenden

Dosis fraktionierter Bestrahlung ausgesetzt. Anhand der sich anschließenden Balken ist die Entwicklung über das der Bestrahlung folgende halbe Jahr dargestellt. Die Werte der bestrahlten Mäuse, die sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ) unterschieden, sind getrennt für den Bestrahlungszeitraums ( $5 \times - 20 \times 100$  mGy) bzw. den Nachbeobachtungszeitraum gekennzeichnet (\*).

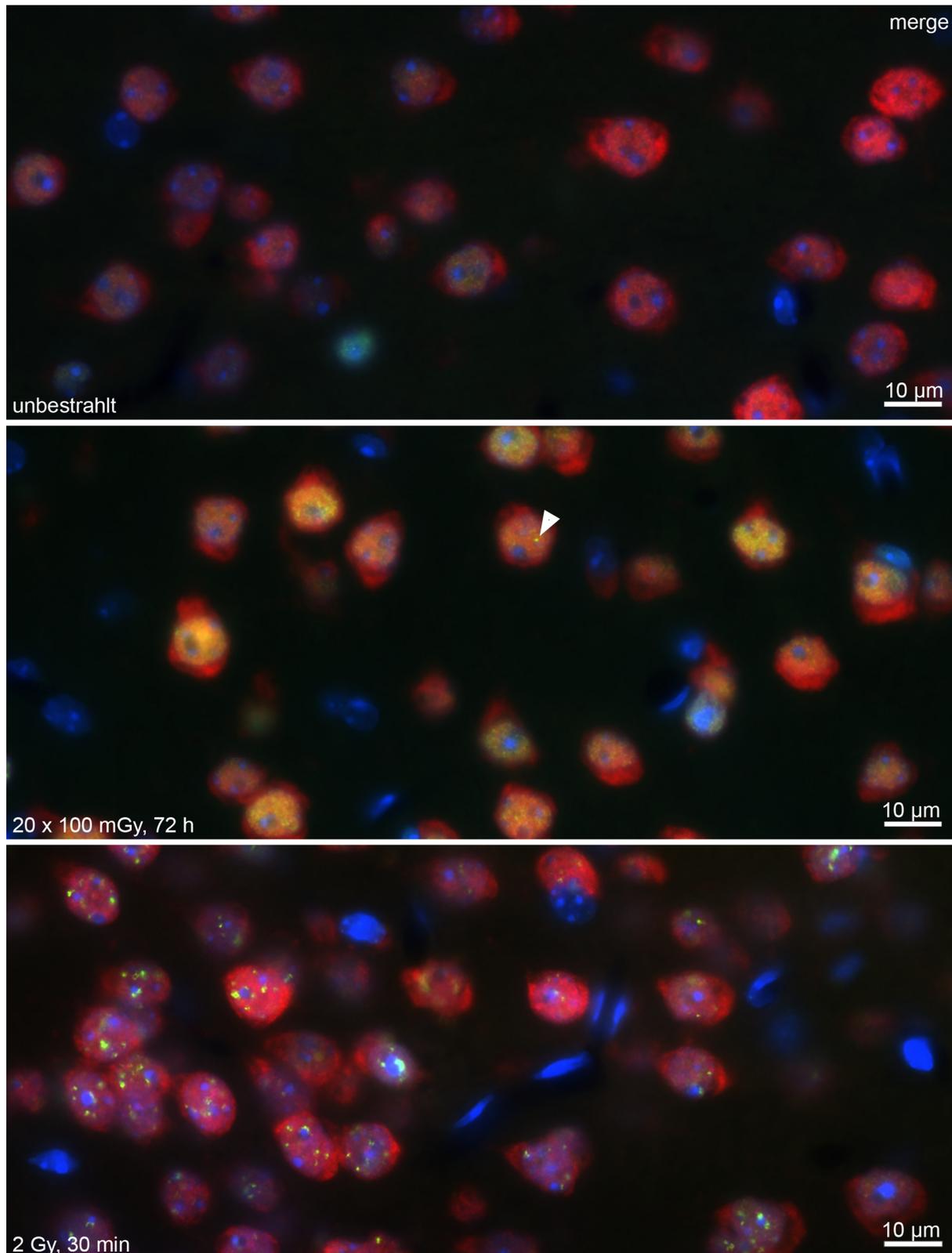
Einwöchig und mehrwöchig fraktionierte Bestrahlung führte jeweils zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,008$ ) der Focuszahl/Neuron der bestrahlten Mäuse im Vergleich zur Kontrolle ( $5 \times 100$  mGy:  $0,091 \pm 0,004$  Foci/Neuron, Kontrolle zu  $5 \times 100$  mGy:  $0,046 \pm 0,006$  Foci/Neuron;  $10 \times 100$  mGy:  $0,096 \pm 0,006$  Foci/Neuron, Kontrolle zu  $10 \times 100$  mGy:  $0,056 \pm 0,003$  Foci/Neuron;  $15 \times 100$  mGy:  $0,109 \pm 0,014$  Foci/Neuron, Kontrolle zu  $15 \times 100$  mGy:  $0,040 \pm 0,002$  Foci/Neuron;  $20 \times 100$  mGy:  $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron, Kontrolle zu  $20 \times 100$  mGy:  $0,052 \pm 0,003$  Foci/Neuron).

Abbildung 5.3 stellt die Entwicklung der 53BP1 Focuszahl/Neuron während der fraktionierten Bestrahlung dar. Eine Zunahme der Mittelwerte ist ablesbar. Im Vergleich zur Bestrahlung mit  $5 \times 100$  mGy ( $0,091 \pm 0,004$  Foci/Neuron) war sie erstmals nach  $20 \times 100$  mGy ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron) signifikant ( $p = 0,016$ ). Zwischen einer fraktionierten Dosis und der zugehörigen nächst höheren war jeweils kein signifikanter Unterschied nachweisbar ( $p_{\min} = 0,421$ ). Der Vergleich von Mäusen, die sich um  $10 \times 100$  mGy applizierter Dosis unterschieden, zeigte kein einheitliches Bild. Wurden sie zuvor mit nur  $5 \times 100$  mGy ( $0,091 \pm 0,004$  Foci/Neuron) bestrahlt, konnte keine signifikante Zunahme ( $p = 0,151$ ) der Focuszahl/Neuron nach insgesamt  $15 \times 100$  mGy ( $0,109 \pm 0,014$  Foci/Neuron) beobachtet werden. Demgegenüber war die Zunahme nach  $20 \times 100$  mGy ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron) im Vergleich zu den Mäusen, die zuvor mit  $10 \times 100$  mGy ( $0,096 \pm 0,006$  Foci/Neuron) bestrahlt wurden, signifikant ( $p = 0,016$ ).

Die Regressionsanalyse der Entwicklung der Focuszahl/Neuron während der fraktionierten Bestrahlung ergab unter der Annahme einer linearen Funktion:

$$(0,076 \pm 0,006) + (0,024 \pm 0,004) \times D$$

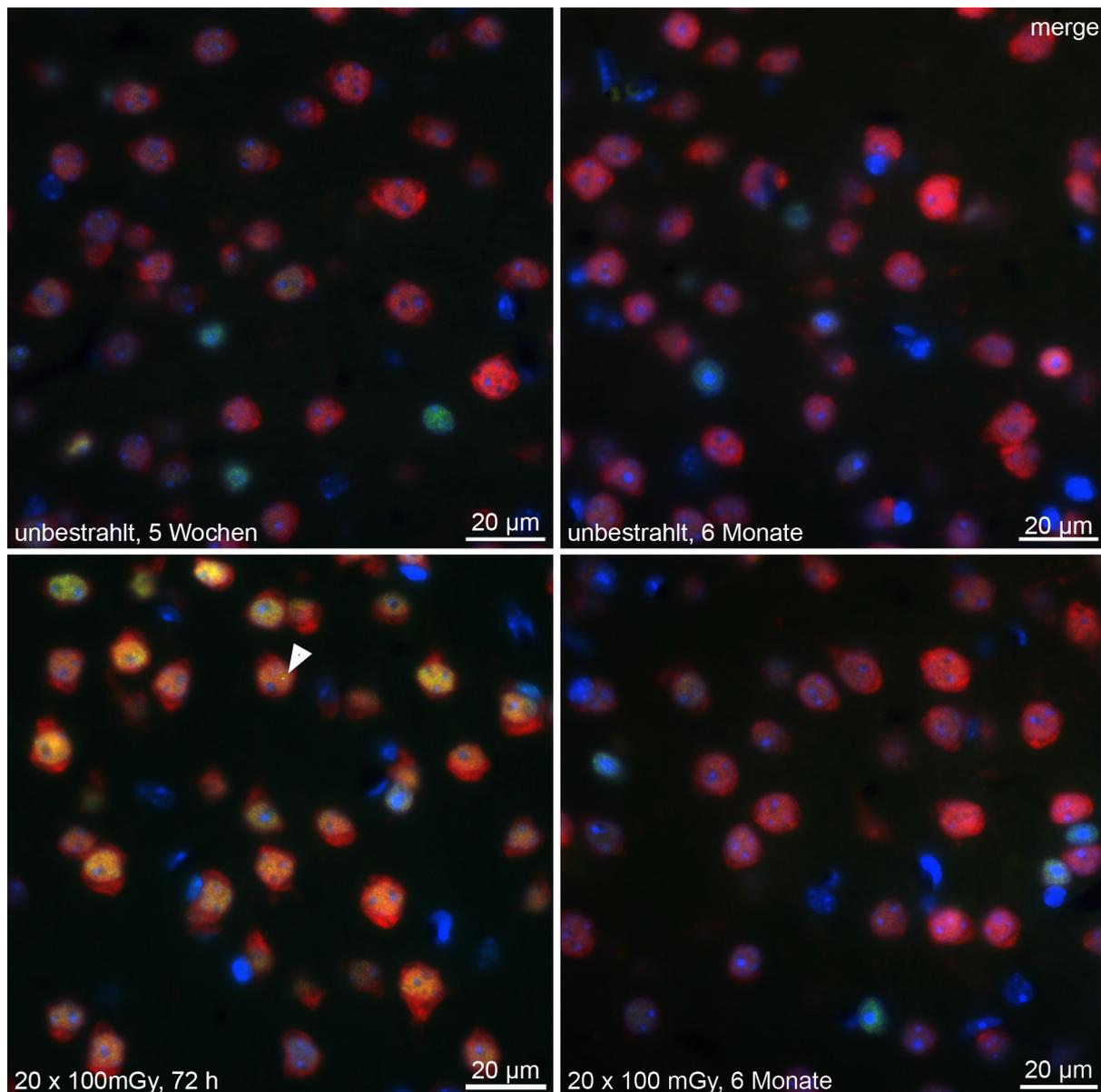
(in Focuszahl/Neuron; D= Dosis in Gy,  $r^2$  (korrigiertes) = 0,918).



**Abbildung 5.4** Übersichtsaufnahmen des zerebralen Kortex

Dargestellt sind überlagerte Aufnahmen (merge, blau: DAPI, rot: NeuN, grün: 53BP1) des zerebralen Kortex: (**oben**) unbestrahlte juvenile 14 Tage alte Maus; (**mitte**) vier Wochen fraktioniert bestrahlte juvenile Maus (20× 100 mGy) 72 Stunden post-IR; (**unten**) einmalige bestrahlte adulte Maus (2 Gy) 30 min post-IR. 72h post-IR ist in den vier Wochen fraktioniert bestrahlten Neuronen, trotz gleicher kumulativer Dosis (2Gy), eine geringere Anzahl der Foci zu finden als 30 min nach einmalig 2Gy.

### 5.3.2 Langzeitentwicklung der 53BP1-Focuszahl/Neuron



**Abbildung 5.5 53BP1 Focuszahl – Langzeitentwicklung nach fraktionierter Bestrahlung**

Dargestellt sind überlagerte Aufnahmen (merge, blau: DAPI, rot: NeuN, grün: 53BP1) des zerebralen Kortex: Einer bestrahlten Maus (untere Zeile) ist jeweils darüber stehend das altersentsprechenden Kontrolltier zugeordnet. Weder bei den unbestrahlten Mäusen, noch bei den bestrahlten Mäusen kam es im Langzeitverlauf zu einer aus den Übersichtsaufnahmen erkennbaren Zunahme der Focuszahl/Neuron. Die durch Auszählen aufgedeckte Abnahme der Focuszahl/Neuron im Langzeitverlauf nach Bestrahlung war nicht repräsentativ visualisierbar.

Die 53BP1 Focuszahl/Neuron juveniler Mäuse wurde im Verlauf eines halben Jahres (72 Stunden, 1 Monat, 3 Monate und 6 Monate post-IR) nach fraktionierter Bestrahlung (20× 100 mGy) untersucht (s. Abbildung 5.3). Nach einer initialen Zunahme der Focuszahl/Neuron zwischen 72 h post-IR ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron) und 1 Monat post-IR ( $0,144 \pm 0,013$  Foci/Neuron) war im weiteren Verlauf ein Rückgang zu erheben. Jene Zunahme war

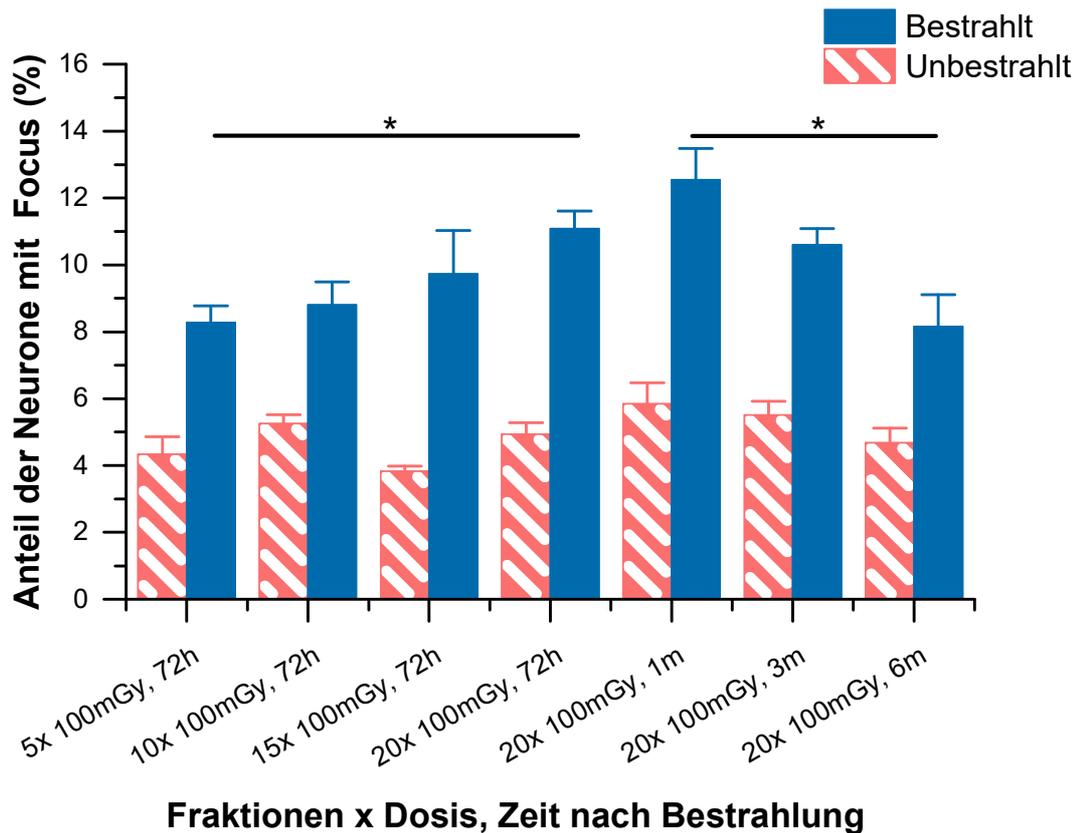
allerdings nicht signifikant ( $p = 0,421$ ). Nach 6 Monaten ( $0,088 \pm 0,011$  Foci/Neuron) konnte erstmals ein signifikanter Rückgang ( $p = 0,032$ ) verglichen mit dem 72 Stunden post-IR erhobenen Wert ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron) beobachtet werden. Das Niveau der unbestrahlten Kontrollmäuse (Kontrolle  $20 \times 100$  mGy, 6 Monate:  $0,049 \pm 0,004$ ) wurde auch 6 Monate post-IR nicht erreicht ( $p = 0,008$ ).

### **5.3.3 Altersabhängige Entwicklung der 53BP1-Focuszahl/Neuron**

Mit Hilfe der Quantifizierung der 53BP1-Focuszahl/Neuron der unbestrahlten Mäuse konnte die Frage beantwortet werden, ob sie sich während der Entwicklung der Mäuse veränderte. Die Focuszahl/Neuron wurde während der ersten vier Wochen wöchentlich (14 Tage, 21 Tage, 28 Tage, 35 Tage alte Tiere) danach bei den 2 Monate, 4 Monate und 7 Monate alten Tieren erfasst. Während der Entwicklung der Mäuse fand im untersuchten Zeitraum keine gerichtete Entwicklung der 53BP1-Focuszahl/Neuron statt (s. Abbildung 5.3). Im Vergleich zur ersten Gruppe im Alter von 14 Tagen ( $0,046 \pm 0,006$  Foci/Neuron) wies keine der folgenden Gruppen einen signifikanten Unterschied in der 53BP1-Focuszahl/Neuron auf ( $p_{\min} = 0,151$ ). Nur die 28 Tage alten Tiere ( $0,040 \pm 0,002$  Foci/Neuron) zeigten zu den 21 Tage ( $0,056 \pm 0,003$  Foci/Neuron), 35 Tage ( $0,052 \pm 0,003$  Foci/Neuron), 2 Monate ( $0,061 \pm 0,007$  Foci/Neuron) und 4 Monate ( $0,058 \pm 0,004$  Foci/Neuron) alten Mäusen einen signifikanten ( $p_{\max} = 0,016$ ) Unterschied in der Focuszahl/Neuron.  $0,049 \pm 0,004$  Foci/Neuron fanden sich bei den ältesten Mäusen im Alter von 7 Monaten.

### **5.4 Anteil Focus-tragender Neurone fraktioniert bestrahlter und unbestrahlter Mäuse**

Mit den Ergebnissen konnte eine mit der Dosis zunehmende Zahl an Foci/Neuron nachgewiesen werden (s. 5.3.1). Infolge der fraktionierten Bestrahlung blieb die Anzahl der 53BP1-Foci/Neuron auch nach einem halben Jahr im Vergleich zu den unbestrahlten Mäusen erhöht. Die Ergebnisse zeigten jedoch nicht, ob der Anstieg durch eine Zunahme der Foci in den Neuronen allgemein zustande kommt oder ob eine Subpopulation derer dafür verantwortlich ist. Deshalb wurde beim Auszählen gleichzeitig dokumentiert, ob und wenn, wie viele Foci eine Zelle besaß. So konnte der Anteil der Zellen mit einem oder mehreren Foci errechnet werden.



**Abbildung 5.6 Anteil der Neurone mit mindestens einem 53BP1-Focus**

Aufgetragen ist der Anteil der Neurone mit mindestens einem Focus der Neuronen (vertikale Achse) nach einer unterschiedlichen Anzahl an Fraktionen bzw. Zeit nach der Bestrahlung (horizontale Achse). Die Balken stellen den Mittelwert der bestrahlten Mäuse (blau) bzw. ihrer zugehörigen Kontrollen (rot) dar. Fehlerbalken entsprechen dem zugehörigen Standardfehler. Mittelwert und Standardfehler beruhen auf fünf Mäusen je Zeitpunkt. Die ersten vier Gruppen wurden jeweils 72 Stunden post-IR ausgewertet. Sie waren einer steigenden Dosis fraktionierter Bestrahlung ausgesetzt. Anhand der sich anschließenden Balken ist die Entwicklung über das der Bestrahlung folgende halbe Jahr dargestellt. Die Werte der bestrahlten Mäuse, die sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ) unterscheidenden, sind getrennt für den Bestrahlungszeitraum ( $5 \times -20 \times 100$  mGy) bzw. den Nachbeobachtungszeitraum gekennzeichnet (\*).

#### 5.4.1 Einfluss zunehmend fraktionierter Bestrahlung auf den Anteil Focus-tragender Neurone

Im Verlauf der fraktionierten Bestrahlung war ein sukzessiver Anstieg des Anteils Focus-tragender Neurone zu beobachten (s. Abbildung 5.6) Die Zunahme war im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $4,33 \pm 0,53$  %) bereits nach der einwöchigen Bestrahlung ( $5 \times 100$  mGy:  $8,28 \pm 0,49$  %) signifikant ( $p = 0,008$ ). Im Zuge der fortgesetzten Bestrahlung zeigte sich erstmals nach 4 Wochen ( $20 \times 100$  mGy,  $12,55 \pm 0,93$  %) ein weiterer signifikanter ( $p = 0,016$ ) Anstieg gegenüber den mit fünf Fraktionen bestrahlten Mäusen. Der Anteil der Focus-tragenden Neurone der zwei Wochen bestrahlten Mäuse ( $8,80 \pm 0,69$  %) unterschied sich

weder von den dreiwöchig ( $9,73 \pm 1,30 \%$ ,  $p = 0,421$ ), noch von den vierwöchig Bestrahlten ( $11,08 \pm 0,54 \%$ ,  $p = 0,056$ ) signifikant.

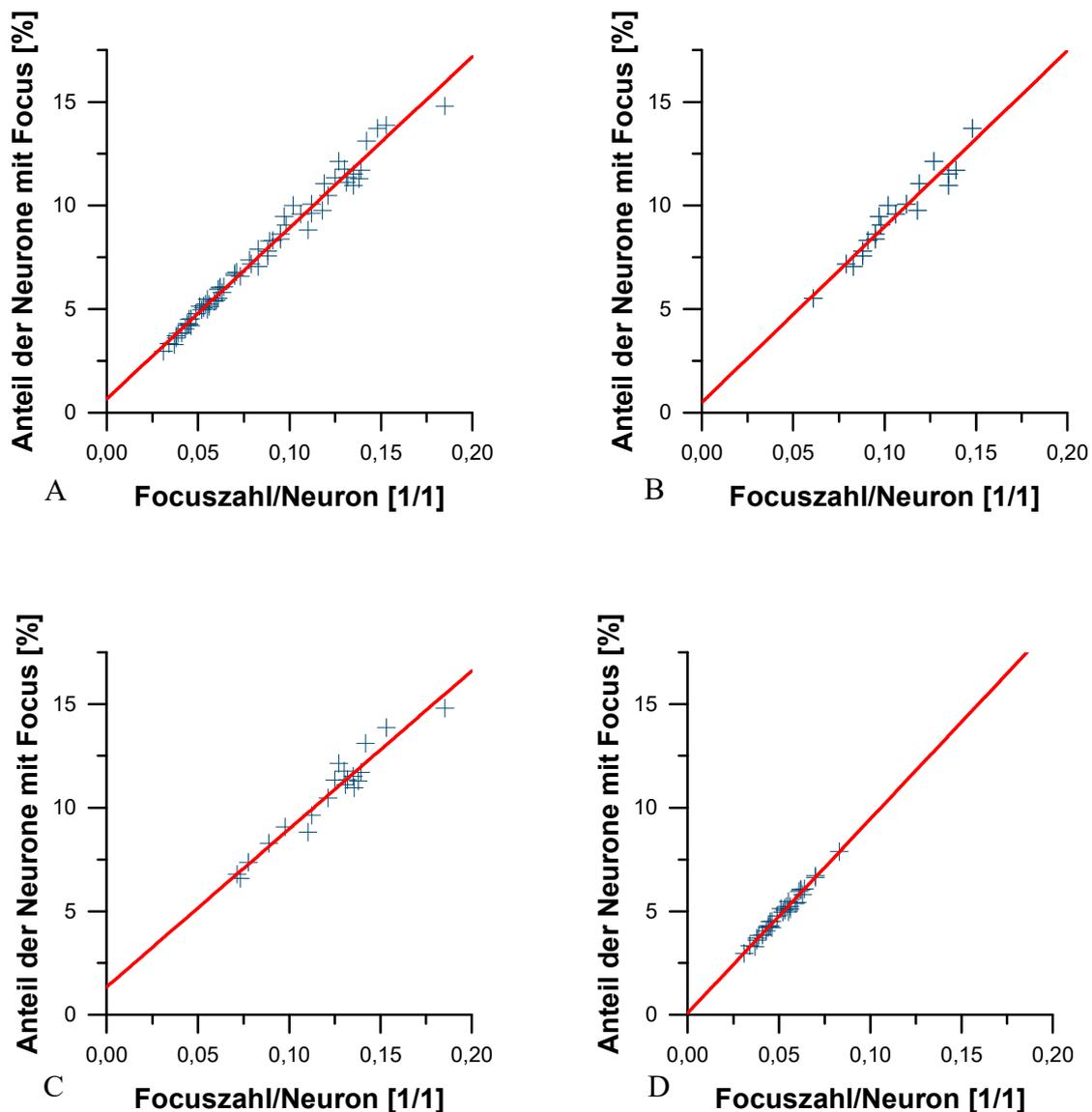
### 5.4.2 Langzeitentwicklung des Anteils 53BP1-Focus-tragender Neurone

Der Anteil Focus-tragender Neurone der vier Wochen fraktioniert bestrahlten Mäuse ( $20 \times 100$  mGy) wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (72 h, 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate post-IR) erhoben. Nach einer Zunahme zwischen 72 h post-IR ( $11,08 \pm 0,54 \%$ ) und 1 Monat post-IR ( $12,55 \pm 0,93 \%$ ) war im weiteren Verlauf eine sukzessive Abnahme zu beobachten (s. Abbildung 5.6). Die initiale Zunahme war nicht signifikant ( $p = 0,310$ ). 6 Monate nach der vierwöchig fraktionierten Bestrahlung erreicht der Anteil Focus-tragender Neurone seinen geringsten Wert ( $8,16 \pm 0,95 \%$ ). Im Vergleich zum Ausgangswert (72 h post-IR) war die Abnahme nicht signifikant ( $p = 0,095$ ). Zu allen Zeitpunkten war der Anteil Focus-tragender Neurone der bestrahlten Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen signifikant ( $p = 0,008$ ) erhöht.

### 5.4.3 Altersabhängige Entwicklung des Anteils 53BP1-Focus-tragender Neurone

In den unbestrahlten Kontrollen wurde der Anteil Focus-tragender Neurone erfasst. Dadurch wurde die Frage beantwortet, ob dieser einer der Entwicklung der Mäuse geschuldete Änderung – insbesondere Zunahme – erfuhr. Während der ersten vier Wochen wurde er wöchentlich (14 Tage alt:  $4,33 \pm 0,53 \%$ ; 21 Tage alt:  $5,25 \pm 0,27 \%$ ; 28 Tage alt:  $3,83 \pm 0,15\%$ ; 35 Tage alt:  $4,94 \pm 0,34 \%$ ), danach bei den 2 Monate ( $5,85 \pm 0,62 \%$ ), 4 Monate ( $5,51 \pm 0,42 \%$ ) und 7 Monate ( $4,68 \pm 0,44 \%$ ) alten Mäusen erhoben. Nur die Gruppe der 28 Tage alten Mäuse unterschied sich signifikant von den 21 Tage ( $p = 0,008$ ), 35 Tage ( $p = 0,016$ ) und 2 Monate ( $p = 0,008$ ) alten Mäusen. Keine der Gruppen wies einen signifikanten Unterschied des Anteils Focus-tragender Neurone zu den 14 Tage alten Mäusen auf ( $p_{\min} = 0,151$ ).

## 5.5 Zusammenhang zwischen Focuszahl/Neuron und Anteil Focus-tragender Neurone



**Abbildung 5.7 Focuszahl/Neuron und Anteil der Neurone mit Focus**

Dargestellt sind die 53BP1-Focuszahl pro kortikalem Neuron (horizontale Achse) und der zugehörige Anteil der Neurone mit mindestens einem Focus (vertikale Achse). Ein Kreuz entspricht dem Wertepaar einer Maus. Die rote Gerade ist das Ergebnis der Regressionsanalyse unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen beiden Größen. (A) Alle Mäuse, (B) Mäuse, die mit 5, 10, 15 oder 20 Fraktionen bestrahlt wurden (72 h nach der letzten Fraktion), (C) Nachbeobachtete Mäuse, die mit 20 Fraktionen a 100 mGy bestrahlt wurden (72 h, 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate post-IR), (D) Kontrolltiere (14 Tage bis 7 Monate alt). Die Werte der Mäuse aller Gruppen (A-D) zeigten eine Erhöhung des Anteils der Focus-tragenden Neurone bei zunehmender Focuszahl/Neuron. Diese Korrelation war signifikant ( $p \leq 0,01$ ).

Die Entwicklung der Focuzahl/Neuron und des Anteils der Focus-tragenden Neuronen (s. Abbildung 5.3 und Abbildung 5.6) ließ eine gleichgerichtete Entwicklung jeweils für bestrahlte und unbestrahlte Mäuse erkennen. Stets war der Anteil Focus-tragender Neurone kleiner als die Focuzahl/Neuron. Eine Korrelationsanalyse wurde getrennt für folgende Gruppen durchgeführt: **(I)** ein bis vier Wochen fraktioniert bestrahlte Mäuse, **(II)** bis zu 6 Monate nachbeobachtete vierwöchig fraktioniert bestrahlte Mäuse, **(III)** Kontrollmäuse.

In allen Gruppen korrelierte die Focuzahl/Neuron mit dem Anteil der Focus-tragenden Neurone. Das Ergebnis der Regressionsanalyse bestätigte die Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Größen für die zunehmend fraktioniert bestrahlten Mäuse ( $(82,589 \pm 1,331) \times F + (0,658 \pm 0,119)$ , F in Focuzahl/Neuron, Pearson  $r = 0,965$ ,  $p \leq 0,01$ ), für die unbestrahlten Kontrollmäuse ( $(94,004 \pm 2,294) \times F + (0,063 \pm 0,121)$ , F in Focuzahl/Neuron, Pearson  $r = 0,990$ ,  $p \leq 0,01$ ) und für die zwischen 72 h post-IR und 6 Monate post-IR untersuchte Langzeitenentwicklung der vierwöchig bestrahlten Mäuse ( $(76,370 \pm 4,591) \times F + (1,339 \pm 0,571)$ , F in Focuzahl/Neuron, Pearson  $r = 0,969$ ,  $p \leq 0,01$ ).

## 6 Diskussion

### 6.1 Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse

Im Folgenden wird zunächst der Einfluss der Dosis fraktionierter Bestrahlung auf die Anzahl der Doppelstrangbrüche bei juvenilen Mäusen diskutiert, und zwar zum einen im Vergleich zu einmalig (s. 6.1.1), zum anderen zu fraktioniert (s. 6.1.2) bestrahlten adulten Mäusen. Anschließend wird der Einfluss des Alters auf die Anzahl von Doppelstrangbrüchen in den unbestrahlten Kontrollmäusen diskutiert (s. 6.1.3). Dabei wird die Vergleichbarkeit von Ergebnissen bei divergenten Hintergrundlevels, das heißt wenn sich die Anzahl von Doppelstrangbrüchen der Kontrollmäuse unterscheiden, diskutiert. Die Kernaussage ist, dass fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung in kortikalen Neuronen juveniler Mäuse mit zunehmender Dosis zu einer Akkumulation von Doppelstrangbrüchen führt, deren Anzahl dennoch geringer ist als bei adulten.

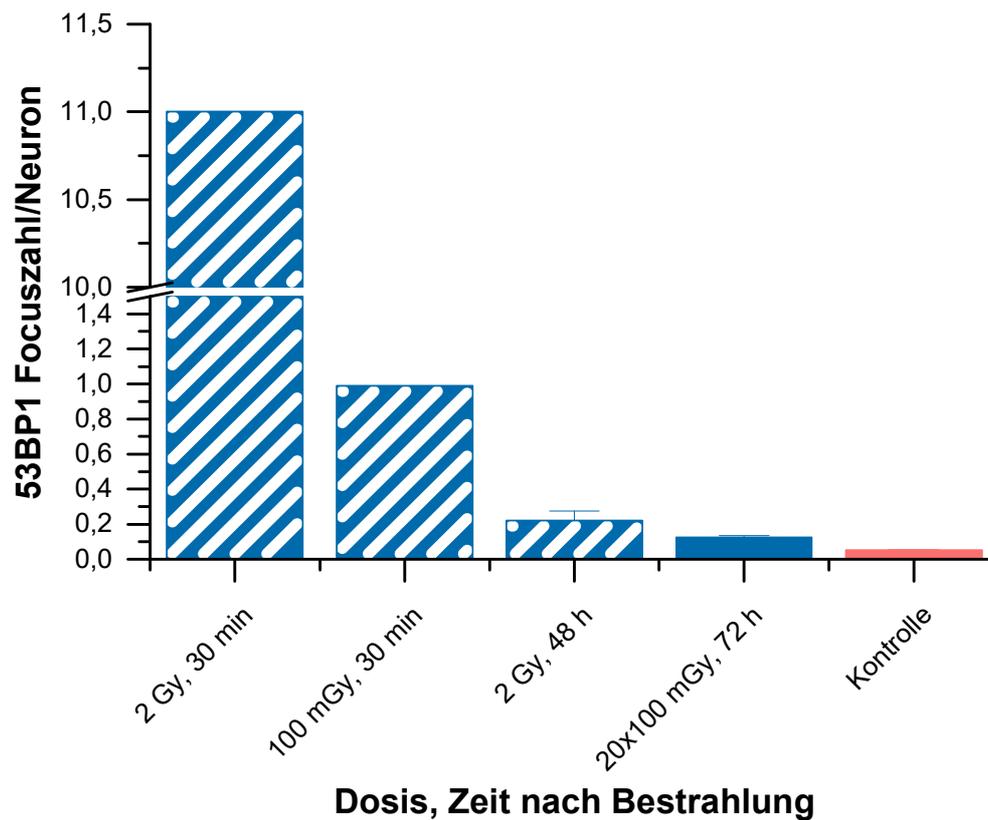
#### 6.1.1 Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach *fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse im Vergleich zu einmalig bestrahlten adulten Mäusen*

Im Folgenden wird der Einfluss der Dosis auf die Anzahl der 72 h post-IR verbliebenen DSBs im Vergleich zu einmalig bestrahlten adulten Mäusen diskutiert. Die Internationale Strahlenschutzkommission empfiehlt, das stochastische Risiko einer Strahlendosis mit dem Linear-Non-Threshold (LNT)-Modell zu bewerten. Dem LNT-Modell entsprechend steigt das Risiko *linear* proportional mit der zunehmenden Strahlendosis an. Eine sichere Schwellendosis (*Threshold*), unter der keine Risikozunahme durch die Strahlung stattfindet, existiert nicht. Auf dieser Empfehlung beruhen weltweit Gesetze, Normen und Regelungen des Strahlenschutzes (ICRP, 2007; ICRP, 2016; Sanders CL, 2009). Während die Datenlage nach einmaliger Bestrahlung gut ist, sind die Risiken zeitlich protrahierter Bestrahlung im Niedrigdosisbereich nicht eindeutig geklärt (Boice JD Jr, 2012). Einige Ergebnisse aus der Literatur für Zeitpunkte von 10-30 min nach einmaliger Bestrahlung stützen das LNT-Modell, da sie eine mit zunehmender Dosis linear steigende Anzahl an DSB-markierenden 53BP1-Foci zeigen (Grudzinski S et al., 2010; Raths A et al., 2008; Rube CE et al., 2011; Ugenskiene R et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit war die Anzahl der DSBs im Verhältnis zur Dosis - übereinstimmend mit einer Reparatur der DSBs – geringer ( $0,024 \pm 0,004$  Foci/(Neuron×Gy)) als bei den adulten Mäusen aus der Literatur 30 min post-IR ( $6-7,7$  Foci/(Neuron×Gy); Rube CE et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit fraktioniert

bestrahlten juvenilen Mäuse zeigten damit im Dosisbereich zwischen  $5 \times 100$  mGy und  $20 \times 100$  mGy auch 72 h post-IR eine linear mit der Dosis zunehmende Anzahl von DSBs (s. 5.3.1). Die Risikobewertung durch das LNT-Modell (s.o.) könnte folglich auch für fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung anwendbar sein, da DSBs die entscheidende radiobiologische Läsion durch Strahlung darstellen (Goodhead DT, 1994) und deren Akkumulation zum Zeitpunkt 72 post-IR linear dosisabhängig ist.

Die in der vorliegenden Arbeit >72 h post-IR untersuchten Mäuse wurden über 4 Wochen allesamt mit derselben Dosis fraktioniert bestrahlt. Daher kann der Zusammenhang zwischen der Dosis und der Anzahl der DSBs >72 h post-IR aus den erhobenen Daten nicht beurteilt werden. Marková E et al. zeigten, dass der lineare Zusammenhang zwischen der Dosis und der Anzahl der DSBs-markierenden Foci (in G0-Lymphozyten) auch einen Monat post-IR erhalten blieb (Marková E et al., 2011). Gegenstand weiterführender Untersuchungen könnte sein, ob der lineare Zusammenhang auch in den Neuronen länger als 72 h post-IR bestehen bleibt. Dadurch könnten wichtige Hinweise gefunden werden, welchen Einfluss die Dosis auf das Risiko von Langzeitfolgen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung hat.

Die Untersuchung adulter Mäuse zeigte, dass die Dosis die Anzahl der induzierten DSBs in den Neuronen adulter Mäuse bestimmt (Rübe CE et al., 2011). Wie in Abschnitt 2.4 der Einleitung ausgeführt, korreliert die Focuszahl mit der induzierten Anzahl der DSBs (Schultz LB et al., 2000). Anhand der nachfolgenden Abnahme der Focuszahl/Neuron wurde der Literatur nach die Effektivität der Reparatur von DSBs bewertet (Rübe CE et al., 2011, Schanz S, 2014). Da in der vorliegenden Arbeit nur Zeitpunkte  $\geq 72$  Stunden post-IR untersucht wurden, kann die Reparatur bis zu diesem Zeitpunkt nicht direkt aus den eigenen Daten beurteilt werden. Deshalb wird die Effektivität der Reparatur von DSBs innerhalb der ersten 72 h post-IR der in der vorliegenden Arbeit fraktioniert bestrahlten juvenilen Mäuse mit Hilfe des folgenden Vergleichs bewertet:



**Abbildung 6.1 Effektivität der Reparatur**

Der Vergleich mit einmalig bestrahlten adulten Mäusen aus der Literatur veranschaulicht, dass selbst nach vierwöchig fraktionierter Bestrahlung ein Großteil der DSBs repariert wird. Der Standardfehler ist bei den eigenen Ergebnissen (20× 100mGy, Kontrolle) und wenn in der Literatur vorhanden mit einem Fehlerbalken angegeben. (2 Gy, 30 min) aus Rube CE et al., 2011, (100 mGy, 30 min) aus Schanz S et al., 2012, (2 Gy, 48 h) aus Schanz S, 2014.

Die Ergebnisse bei *einmalig bestrahlten* adulten Mäusen aus der Literatur zeigen einen Rückgang der Focuszahl/Neuron und damit eine Reparatur der zugrundeliegenden DSBs mit zunehmender Zeit post-IR (2 Gy, 30 min post-IR: circa 11 Foci/Neuron (Rube CE et al., 2011); 2Gy, 48 h post-IR:  $0,222 \pm 0,052$  Foci/Neuron (Schanz S, 2014)). Verglichen mit diesen Ergebnissen ist auch in der vorliegenden Arbeit von einer effektiven Reparatur der DSBs auszugehen, da die Focuszahl/Neuron der *fraktioniert bestrahlten* juvenilen Mäuse 72 h post-IR bei gleicher kumulativer Dosis (20× 100mGy) geringer ist ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron) als bei den genannten adulten Mäusen 48 h post-IR (s.o., Schanz S, 2014). Da zum Zeitpunkt 72 h post-IR keine Ergebnisse einmalig bestrahlter adulter Mäuse vorliegen, ist aufgrund der unterschiedlichen Zeit nach Bestrahlung, das heißt der unterschiedlichen langen Zeit für eine mögliche Reparatur, keine Aussage darüber möglich, ob die Reparatur der juvenilen Mäuse effektiver war. Die geringere Erhöhung der Focuszahl der juvenilen Mäuse könnte auch von der längeren Reparaturzeit (72 h) verglichen mit derjenigen der adulten

Mäuse (48 h) her rühren. Dabei ist hervorzuheben, dass selbst die Bestrahlung mit der Dosis einer der vorliegenden Arbeit entsprechenden Einzelfraktion zu einer höheren Anzahl an DSBs führt ( $1 \times 100$  mGy: 0,99 Foci/Neuron; Schanz S et al., 2012) als sie bei den juvenilen Mäusen in der vorliegenden Arbeit 72 h post-IR (s.o.) nachweisbar war. Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass bei den juvenilen Mäusen trotz der vierwöchigen Bestrahlung ein Großteil der DSBs innerhalb von 72 h post-IR repariert wird.

### **6.1.2 Einfluss der Dosis auf die Anzahl persistierender DSBs nach *fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse im Vergleich zu fraktioniert bestrahlten adulten Mäusen***

Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung kommt es bei juvenilen Mäusen zu einer Annäherung der Anzahl 72 h post-IR verbliebener DSBs an die Anzahl der adulten Mäuse, womit sich ihre Reparaturreffektivität jener der adulten angleicht. Dies wird nachfolgend erläutert:

*In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Effizienz der Reparatur von DSBs durch NHEJ in Neuronen mit zunehmendem Alter abnimmt (Ren K et Peña de Ortiz S, 2002; Sharma S, 2007; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006). Die Anzahl der DSBs nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist *in vivo* bislang nur für die Neuronen adulter Mäuse mit Hilfe der 53BP1-Focuszahl untersucht (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von jenen der juvenilen Mäuse aus der vorliegenden Arbeit im Ausmaß des Rückgangs der Focuszahl/Neuron sowie im Einfluss der Dosis auf diesen Rückgang:

Den eigenen Ergebnissen zufolge erhöht sich die Focuszahl/Neuron bei den juvenilen Mäusen im Dosisbereich zwischen  $10 \times 100$  mGy ( $0,096 \pm 0,006$  Foci/Neuron) und  $20 \times 100$  mGy ( $0,127 \pm 0,008$  Foci/Neuron; s. 5.3.1). Dagegen erhöht sich die Focuszahl/Neuron bei den adulten Mäusen im genannten Dosisbereich nicht (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). Vergleicht man aber die relative Erhöhung der Focuszahl/Neuron zur Kontrolle, so zeigt sich, dass sie bei den juvenilen Mäusen selbst nach der maximalen Dosis der vorliegenden Arbeit unter derjenigen der adulten liegt ( $20 \times 100$  mGy, 72 h post-IR: juvenil 2,44-fach – adult 2,61-fach, Schanz S, 2014). Damit wird deutlich, dass sich die Effektivität der Reparatur von DSBs der juvenilen Mäuse der geringeren der adulten Mäuse annähert. Demgegenüber bleibt die Effektivität der adulten im vergleichbaren Dosisbereich (bis  $20 \times 100$  mGy) auf bereits schlechterem aber altersentsprechenden Niveau konstant (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014).

Bei den adulten Mäusen steigt die Focuszahl/Neuron 72 h post-IR erst nach einer höheren Anzahl an Fraktionen bzw. einer höheren Dosis als in der vorliegenden Arbeit. Ein statistischer Vergleich zwischen den adulten Mäusen fehlte in den genannten Arbeiten (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Anteils der Focus-tragenden Neurone erhoben, wie die DSBs auf die Gesamtheit der untersuchten Neuronen verteilt sind. Der Anteil Focus-tragender Neurone nahm von den einwöchig fraktioniert bestrahlten Mäusen ( $5 \times 100$  mGy:  $8,28 \pm 0,49$  %) zu den 4 Wochen fraktionierten bestrahlten Mäusen ( $20 \times 100$  mGy,  $12,55 \pm 0,93$  %) signifikant ( $p = 0,016$ ) zu und korrelierte linear mit der Focuszahl/Neuron (Pearsons  $r = 0,965$ ; s. 5.4.1). Die Akkumulation der DSBs beruhte demnach bei den juvenilen Mäusen mitunter auf einer steigenden Anzahl an Neuronen mit (mindestens) einem Focus. Das heißt, sie fand nicht nur in den Neuronen statt, die bereits einen Focus aufwiesen. Dennoch besaß nur ein Bruchteil der Neurone einen Focus (s.o.). Gegenstand weiterführender Untersuchungen könnte sein, worin sich die Focus-tragenden Neuronen von denjenigen ohne Focus unterscheiden. Bei den adulten Mäusen aus der Literatur wurde der zugehörige Anteil Focus-tragender Neurone nicht angegeben (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014), weshalb dessen Entwicklung nicht mit derjenigen der juvenilen Mäuse verglichen werden kann.

Es stellt sich die Frage, was die geringere Anzahl der 53BP1-Foci bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit erklärt. Zum einen ist bekannt, dass die Aktivität des NHEJ, dem Reparaturweg der DSBs in Neuronen, bei jüngeren Mäusen höher ist als bei älteren (Ren K et Peña de Ortiz S, 2002; Sharma S, 2007; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006). Zum anderen markiert 53BP1 DSBs überwiegend im Heterochromatin, was eine Abhängigkeit der 53BP1-Focuszahl von der Menge an Heterochromatin (s. 2.3.1) zur Folge haben könnte (Lorat Y et al., 2012). Darüber hinaus könnte die Entwicklung bzw. die mit ihr einhergehend steigende Hirnaktivität der älter werdenden juvenilen Mäuse für die zunehmende 53BP1-Focuszahl verantwortlich sein, denn diese kann zu Foci führen (Suberbielle E et al., 2013).

Die höhere NHEJ Aktivität jüngerer Mäuse (Ren K et Peña de Ortiz S, 2002; Sharma S, 2007; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006) bietet eine mögliche Erklärung für die geringere Erhöhung der 53BP1-Focuszahl/Neuron der juvenilen Mäuse in der vorliegenden Arbeit verglichen mit den adulten aus der Literatur (s.o., Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass trotz des schnelleren Rückgangs der DSBs jüngerer Mäuse gegenüber älteren Mäusen aus publizierten Daten die Anzahl der persistierenden DSBs 48 h nach einmaliger Bestrahlung keine Altersabhängigkeit zeigte (Schanz S, 2014).

Wie bereits beschrieben (s.o.) markieren 53BP1-Foci die DSBs überwiegend im Heterochromatin (Lorat Y et al., 2012). Damit könnte die Menge an Heterochromatin eine mögliche Erklärung für die Anzahl der 53BP1-Foci sein. Neurone adulter Tiere könnten insgesamt mehr Heterochromatin besitzen. Dadurch würde möglicherweise ein größerer Anteil der DSBs durch 53BP1 markiert werden, was die höhere Anzahl der 53BP1-Foci der adulten Mäuse gemäß publizierter Daten (s.o., Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014) verglichen mit den juvenilen in der vorliegenden Arbeit erklären könnte. Dagegen spricht, dass es mit steigendem Lebensalter zu einer Abnahme des Heterochromatins kommt (Tsurumi A et Li WX, 2012). Die Menge an Heterochromatin bietet dennoch eine mögliche Erklärung für die bei steigender Dosis zunehmende Focuszahl/Neuron, da sie durch Bestrahlung zunehmen kann (Sato K et al., 2014).

Hirnaktivität führt zu einer Erhöhung der Focuszahl (Suberbielle E et al., 2013). Altersbedingte Unterschiede der Hirnaktivität könnten demnach die Abweichungen der 53BP1-Focuszahl/Neuron der juvenilen Mäuse erklären (s.o.). Eine entwicklungsbedingt veränderte Hirnaktivität bzw. ein auf dem Alter beruhender Einfluss scheiden aber als Gründe für die Zunahme der 53BP1-markierten DSBs der juvenilen Mäuse im Laufe der fraktionierten Bestrahlung aus, da die altersentsprechenden unbestrahlten Kontrollmäuse keine Erhöhung zeigten.

Es ist folglich davon auszugehen, dass die steigende Focuszahl/Neuron der juvenilen Mäuse auf der zunehmenden Anzahl an Fraktionen bzw. der zunehmenden Dosis beruht. Die dabei beobachtete Annäherung der Focuszahl/Neuron an die konstant bleibend höhere der adulten Mäuse (s. 6.1.1., Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014) zeigt, dass die Anzahl der Fraktionen bzw. die Dosis die Effektivität der Reparatur von DSBs bei den juvenilen der vorliegenden Arbeit stärker beeinflusst. Eine zunehmende Anzahl an Fraktionen bzw. eine steigende Dosis fraktionierter Bestrahlung ist damit bei geringerem Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung als besonders kritisch zu bewerten.

### **6.1.3 Einfluss des Alters der Kontrollmäuse auf die Akkumulation von DSBs**

Die Literatur zeigt kein einheitliches Bild, was den Einfluss des Alters auf die Anzahl 53BP1-Focus-markierter DSBs und damit Effektivität der Reparatur in Neuronen betrifft. Bis zum Alter von 2 Jahren stellten Le O et al. keine Erhöhung des Anteils der Focus-tragenden Neurone ihrer unbestrahlten Kontrollmäuse fest (Le O et al., 2010). Demgegenüber zeigte Schanz S, dass sich die Focuszahl/Neuron von den jungen Mäusen (14 Tage alt:  $0,030 \pm 0,002$  Foci/Neuron, 3 Monate alt:  $0,032 \pm 0,006$ ) zu den alten Mäusen (24 Monate alt:  $0,069 \pm$

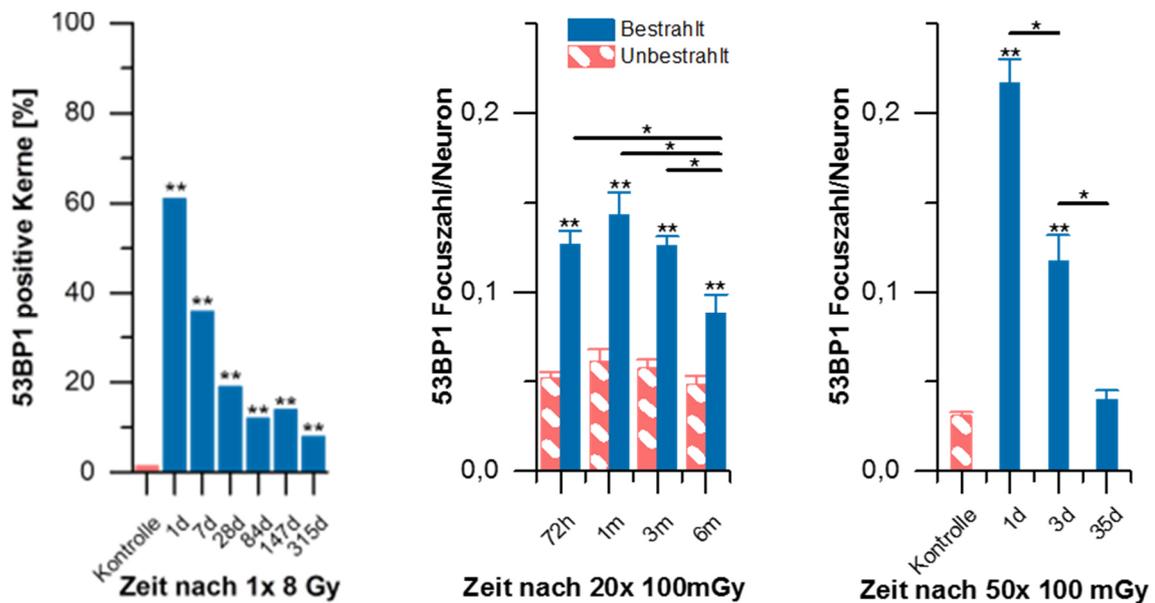
0,006) hin signifikant erhöht (Schanz S, 2014). Der bei Le O et al. nur aus dem Diagramm ablesbare Wert liegt in der Größenordnung von etwa 2,5 % Focus-tragender Zellen (Le O et al., 2010). Wird eine der vorliegenden Arbeit entsprechende Korrelation (s. 5.5) der Focuszahl/Neuron und des Anteils der Focus-tragenden Neurone angenommen, liegt dieser Wert auf vergleichbarem Niveau wie bei Schanz S (Schanz S, 2014). Damit liegen die Werte der beiden genannten Autoren unter denjenigen der vorliegenden Arbeit (14 Tage alt:  $0,046 \pm 0,006$  Foci/Neuron). Die Neurone von Mäuseembryos haben dagegen eine höhere Focuszahl (0,1-0,2 Foci/Neuron) als die juvenilen Mäuse der vorliegenden Arbeit. Woodbine L et al. begründen dies mit einer leicht erhöhten Sensitivität ihres verwendeten Antikörpers (Woodbine L et al., 2015). Diese kann jedoch nicht für den Unterschied verantwortlich sein, da der gleiche Antikörper wie in der vorliegenden Arbeit und bei Schanz S eingesetzt wurde (Saha S et al, 2014; Schanz S, 2014; Woodbine L et al., 2015). Die Verwendung kryokonservierter Schnitte und unterschiedliches Prozessieren (Saha S et al., 2014; Woodbine L et al., 2015) scheiden als Gründe für die höhere Focuszahl ebenfalls aus, da Woodbine L et al. ein vergleichbares Verfahren wie Le O et al. nutzten (Le O et al., 2010). Deren gute Übereinstimmung mit den Werten von Schanz S wurde bereits diskutiert (s.o.). Schanz S nutzte in ihrer Dissertation dasselbe Verfahren wie in der vorliegenden Arbeit (Schanz S, 2014). In den Neuronen der Mäuseembryos ist die erhöhte Focuszahl möglicherweise entwicklungsbedingt zu erklären, da bei der Differenzierung von neuronalen Zellen ein Rückgang der Focuszahl bzw. Anzahl der DSBs beobachtet wurde (Torres G et al., 2015).

Das Auszählen bietet eine Erklärung, warum die *absoluten* Werte der Focuszahl/Neuron bzw. des Anteils Focus-tragender Neurone in der vorliegenden Arbeit über denjenigen von Schanz und von Le O et al. (s.o.) liegen: Schanz S untersuchte ebenfalls unbestrahlte, 2 Wochen alte Mäuse. Deren Focuszahl/Neuron war geringer als bei den gleichaltrigen Mäusen in der vorliegenden Arbeit (s.o., Schanz S, 2014). Im Folgenden wird deshalb die relative Entwicklung zwischen den Untersuchungszeitpunkten verglichen. Warum die *relative* Entwicklung aussagekräftiger ist, wird in Kapitel 6.4.5.2 diskutiert. Schanz S beschrieb eine Konstanz der Focuszahl/Neuron zwischen dem 14. Lebenstag ( $0,030 \pm 0,002$  Foci/Neuron) und dem 3. Lebensmonat ( $0,032 \pm 0,006$ ) (Schanz S, 2014). Diese fand sich auch in der vorliegenden Arbeit. Zudem kann der vorliegenden Arbeit nach der Zeitraum, in welchem keine mit dem Alter der Mäuse in Zusammenhang stehende Zunahme der Focuszahl/Neuron zu beobachten war, auf 7 Monate alte Mäuse erweitert werden (14 Tage alt:  $0,046 \pm 0,006$  Foci/Neuron, 7 Monate alt:  $0,049 \pm 0,004$  Foci Neuron).

Der Literatur nach scheint nach diesem Zeitpunkt mit zunehmendem Alter eine Subpopulation von Neuronen Foci bzw. DSBs zu akkumulieren: Das heißt, der Anteil der Focus-tragenden Zellen bleibt bis zum Alter von 24 Monaten konstant (Le O et al., 2010), aber gleichzeitig steigt die Focuszahl/Neuron zwischen 3 Monate alten und 2 Jahren alten Mäusen an (Schanz S, 2014). In der vorliegenden Arbeit änderte sich bis zum Alter von 7 Monaten weder der Anteil der Focus-tragenden Neurone noch die Focuszahl/Neuron signifikant. Das ist bemerkenswert, da sowohl während der embryonalen Entwicklung (Woodbine L et al., 2015) als auch durch physiologische Hirnaktivität mit 53BP1-Foci markierbare DSBs entstehen (Suberbielle E et al., 2013). Durch in vitro Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Aktivität der Reparatur von DSBs mit zunehmendem Alter der Mäuse abnimmt (Ren K et Peña de Ortiz S, 2002; Sharma S, 2007; Vyjayanti VN et Rao KS, 2006). Dennoch hat den eigenen Ergebnissen zu Folge das Lebensalter der Mäuse innerhalb der ersten 7 Lebensmonate keinen Einfluss auf die Anzahl der Doppelstrangbrüche.

### **6.2 Zeitliche Entwicklung der Anzahl persistierender DSBs nach fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse**

Im Folgenden wird die zeitliche Entwicklung der Anzahl persistierender Doppelstrangbrüche nach *fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung juveniler Mäuse* diskutiert. Deren Entwicklung wird zum einen mit derjenigen von ebenfalls *fraktioniert bestrahlten adulten* Mäusen (s. 6.2.1), zum anderen mit *einmalig hoch dosiert bestrahlten adulten* Mäusen (s. 6.2.2) vergleichend diskutiert. Die Kernaussage der Diskussion ist, dass es nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung bei den juvenilen Mäusen zu einer längeren Persistenz von strahlungsbedingten Doppelstrangbrüchen als bei adulten kommt. Diese längere Persistenz bei juvenilen ähnelt derjenigen bei adulten, wenn letztere einmalig höher dosiert bestrahlt werden. Die Schwere des längerfristigen Strahlenschadens nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist demnach im juvenilen Gehirn als vergleichsweise hoch zu bewerten.



**Abbildung 6.2 Zeitliche Entwicklung von DNA-Schäden nach Bestrahlung**

Resultaten der vorliegenden Arbeit (Mitte) werden Ergebnisse der Literatur gegenübergestellt: Einmalig hochdosiert bestrahlte Tiere (links, Abbildung nach Le O et al., 2010), adulte fraktioniert bestrahlte Mäuse (rechts, Abbildung nach Schanz S, 2014). Die Abbildung nach Le O et al. beruht auf abgelesenen Werten aus deren Diagramm. Zwischen den Zeitpunkten lagen keine Angaben über die die Signifikanz der Änderungen vor. In den beiden anderen Diagrammen sind signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten Gruppen gekennzeichnet (\*). Ein signifikanter Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle ist in allen Diagrammen markiert (\*\*).

### 6.2.1 Zeitliche Entwicklung der Anzahl von DSBs nach *fraktionierter Bestrahlung* juveniler Mäuse im Vergleich zu *fraktioniert bestrahlten* adulten Mäusen

Bislang existierten für die Anzahl persistierender DSBs in Abhängigkeit von der Zeit nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung nur publizierte Daten für adulte Mäuse. Sie wurden mit Hilfe der 53BP1-Focuzahl erfasst (Schanz S et al., 2012; Schanz S, 2014). Der Vergleich mit den Ergebnissen juveniler Mäuse der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die Focuzahl  $\geq 72$  h post-IR abhängig von Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Bestrahlung ist.

Die Focuzahl/Neuron der adulten Mäuse nahm im Zeitraum zwischen 72 h post-IR und 35 Tagen post-IR signifikant ab und erreichte wieder das Niveau der unbestrahlten Kontrolle (35 d nach  $50 \times 100$  mGy:  $0,040 \pm 0,005$ ; Kontrolle:  $0,031 \pm 0,002$  Foci/Zelle) (Schanz S, 2014). Demgegenüber kam es bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit (s. 5.3.2) zu keiner signifikanten Änderung der Focuzahl/Neuron zwischen 72 h post-IR und 1 Monat post-IR. Die geringe Erhöhung der Focuzahl/Neuron 1 Monat post-IR ist vermutlich mit einer methodenbedingten Messunschärfe zu begründen. Die juvenilen Mäuse zeigten damit weiterhin eine erhöhte Focuzahl/Neuron im Vergleich zur Kontrolle ( $20 \times 100$  mGy, 1 Monat post-IR:  $0,144 \pm 0,013$ ; Kontrolle:  $0,061 \pm 0,006$ , 2,36-fach, s. 5.3.2). Sie nahm erstmals 6 Monate post-IR signifikant ab. Dennoch wurde das Niveau der unbestrahlten Kontrolle nicht

erreicht (s. 5.3.2). Würden andernorts publizierte Ergebnisse nach einmaliger Bestrahlung auf den vorliegenden Vergleich nach fraktionierter Bestrahlung übertragen, wäre bei den juvenilen Mäusen aufgrund ihres Alters ein schnellerer Rückgang der Focuszahl/Neuron als bei den adulten Mäusen zu erwarten gewesen: Schanz S konnte zwar 48 Stunden post-IR (2 Gy) keinen altersabhängigen Unterschied der Anzahl persistierender DSBs feststellen, im vorhergehenden zeitlichen Verlauf war die Anzahl der DSBs der einmalig bestrahlten Mäuse jedoch umso geringer, je jünger sie zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren (Schanz S, 2014). Wie bereits diskutiert (s. 6.1.2), war die Anzahl persistierender DSBs 72 h nach fraktionierter Bestrahlung bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit im Verhältnis zur Kontrolle noch weniger stark erhöht als der Literatur nach bei den adulten Mäusen (20× 100 mGy, 72 h post-IR: juvenil 2,44-fach – adult 2,61-fach, Schanz S, 2014). Da die Focuszahl/Neuron der juvenilen Mäuse danach aber einen geringeren Rückgang zeigte, war sie 1 Monat post-IR im Verhältnis zur Kontrolle stärker erhöht (2,36-fach) als bei den adulten Mäusen 35 Tage post-IR (1,29-fach; Schanz S, 2014).

Betrachtet man die Auswirkung der kumulativen Dosis auf die Persistenz der Foci bzw. der damit markierbaren DSBs, wird ein weiterer Widerspruch deutlich: Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten juvenilen Mäuse erhielten eine Gesamtdosis von 2 Gy, während die adulten von Schanz S mit insgesamt 5 Gy bestrahlt wurden (Schanz S, 2014). Aufgrund der geringeren Dosis wäre bei den juvenilen Mäusen eine kürzere Persistenz der Foci zu erwarten gewesen, da die Dauer der Persistenz (allerdings in hämatopoetischen Stammzellen) mit steigender Dosis zunahm (Guo CY et al., 2015).

Diese Diskussion unterliegt allerdings der folgenden Einschränkung: Die reduzierte bzw. fehlende Kolo-kalisation von 53BP1 mit dem DSB-Marker  $\gamma$ H2AX oder mit Reparaturproteinen (RPA70, pKu70) deutet an, dass zu den untersuchten Zeitpunkten keine *aktive* Reparatur von DSBs mehr stattfindet (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Marková E et al., 2011; Rodier F et al., 2011). Daher ist es fraglich, ob die Reparatur von DSBs die unerwartet langsamere Abnahme der Focuszahl/Neuron >72 h post-IR bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten juvenilen Mäuse im Vergleich zu adulten aus der Literatur erklären kann (s.o.). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass es sich bei den persistierenden Foci um permanente Chromatinmodifikationen nach vorausgegangenen DNA-Schäden handelt, die die Genexpression verändern und dadurch die Funktionsfähigkeit der Zelle beeinflussen könnten (Schanz S et al., 2012). Das Fehlen des DSB-Marker  $\gamma$ H2AX oder von Reparaturproteinen (RPA70, pKu70) bei den 53BP1-Foci (s.o., Lorat Y et al., 2012; Lorat

Y et al., 2015; Marková E et al., 2011; Rodier F et al., 2011) kann jedoch nicht als sicheres Zeichen dafür gewertet werden, dass diese 53BP1-Foci nicht weiterhin – wie <24 h post-IR (Schultz LB et al., 2000) – DSBs markieren. Wenn es sich daher bei den >72 h post-IR persistierenden Foci um DSBs handelt, so war die Fähigkeit der Neurone, diese DSBs zu reparieren, bei den juvenilen Mäusen geringer als bei den adulten Mäusen aus der Dissertation von Schanz S, da die DSBs bei den juvenilen länger persistierten (s.o., Schanz S, 2014). Der DNA-Schaden nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist folglich bei geringerem Alter bei Bestrahlung langfristig als schwerwiegender zu bewerten als bei höherem Alter zu diesem Zeitpunkt.

### **6.2.2 Zeitliche Entwicklung der Anzahl von DSBs nach *fraktionierter Bestrahlung juveniler Mäuse im Vergleich zu einmalig hochdosiert bestrahlten adulten Mäusen***

In der Literatur ist eine sehr lange Persistenz von Foci (45 Wochen post-IR) im Gehirn adulter Mäuse nur nach einer deutlich höheren Dosis ( $1 \times 8\text{Gy}$ ) als in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Le O et al., 2010). Während die Focuzahl/Neuron der juvenilen Mäuse erstmals 6 Monate nach der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung signifikant abnahm, halbierte sich etwa der Anteil der Zellen mit Focus bei den adulten zwischen 1 Woche und 21 Wochen nach der einmalig hochdosierten Bestrahlung (Le O et al., 2010). Wie in Kapitel 6.2.1 diskutiert gibt es Hinweise, dass zu den untersuchten Zeitpunkten keine aktive Reparatur mehr stattfindet (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Marková E et al., 2011; Rodier F et al., 2011). Demnach ist es unklar, ob es sich zu den genannten Zeitpunkten bei den Foci noch um nicht reparierte DSBs handelt und die juvenilen Mäuse damit nicht in der Lage waren, diese verbliebenen DSBs zu reparieren. Allerdings sind diese Hinweise nicht beweisend dafür, dass die 53BP1-Foci nicht weiterhin persistierende DSBs markieren (s. 6.2.1).

Eine lange Persistenz von Foci wurde in vorangegangenen Studien infolge einer einmalig hoch dosierten Bestrahlung (8 Gy - 53 Gy) in weiteren Zellarten (neben den Neuronen auch in Alveolar-/Bronchialzellen, Keratinozyten) beobachtet. In vergleichbaren Zeiträumen, wie in der vorliegenden Arbeit gewählt, war dabei von einem höheren Niveau ausgehend eine deutliche Abnahme der Foci zu beobachten (Ahmed EA et al., 2012; Le O et al., 2010; Rodier F et al., 2011). Aus der Literatur ist bekannt, dass ein vollständiger Rückgang von vormals lange Zeit (70 Tage) persistierenden Foci nach einmalig hoch dosierter Bestrahlung möglich ist. Einschränkend handelte es sich jedoch um Keratinozyten, die in dieser Zeit einem Zellumsatz unterliegen. Dabei werden die Focus-tragenden Zellen durch Apoptose entfernt (Ahmed EA et al., 2012). Die Neurone adulter Mäuse zeigten aber selbst nach einer höheren

Dosis als in der vorliegenden Arbeit keine Apoptose (Schanz S et al., 2012). Apoptose ist deshalb als Erklärung für den beobachteten späten Rückgang der Foci bei den juvenilen Mäusen in der vorliegenden Arbeit - anders als bei den Keratinozyten (Ahmed EA et al., 2012) – unwahrscheinlich. Zudem nahm in der vorliegenden Arbeit die Focuszahl/Neuron zwischen 72 h post-IR und 6 Monate post-IR signifikant ab (s. 5.3.2), während der Anteil der Focus-tragenden Neuronen zwar entsprechend der hochgradig linearen positiven Korrelation abnahm, die Abnahme jedoch nicht signifikant war (s. 5.4.2). Das heißt, der Rückgang der Focuszahl kann nicht allein auf dem Schwund der Focus-tragenden Neurone beruhen. Im Zeitraum zwischen 72 h post-IR 6 Monate post-IR persistierte folglich ein Teil der DSBs eines Neurons, während andere repariert werden konnten.

Wird eine der vorliegenden Arbeit entsprechende Korrelation (s. 5.5) der Focuszahl/Neuron und des Anteils der Focus-tragenden Zellen angenommen, liegt der Wert der adulten Mäuse bei Le O et al. 45 Wochen post-IR (abgelesener Wert circa 7,5% Anteil Focus-tragender Zellen; Le O et al., 2010) auf vergleichbarem Niveau wie bei den juvenilen Mäusen in der vorliegenden Arbeit 6 Monate post-IR ( $0,088 \pm 0,011$  Foci/Neuron; s. Abbildung 5.3). Die hohe Focuszahl/Neuron der juvenilen Mäuse deutet darauf hin, dass sie in der Langzeitentwicklung >72 h nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung vergleichbar schwer betroffen sind wie adulte Mäuse nach einmaliger aber höher dosierter Bestrahlung. Die Schwere des längerfristigen Strahlenschadens nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ist demnach als vergleichsweise hoch zu bewerten.

### **6.3 Schlussfolgerung**

Das juvenile Gehirn ist besonders stark gegenüber fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung vulnerabel. Dosissteigerungen sind daher als kritisch zu bewerten. Besonders schwerwiegend erscheint die Vulnerabilität im langfristigen Verlauf. Die vorliegende Arbeit liefert damit Hinweise, dass selbst die niedrigen Dosen, wie sie im Randbereich der Zielvolumina gerade durch den Einsatz hochkonformaler Bestrahlungstechniken vermehrt auftreten (Hall EJ et Wuu CS, 2003), nicht zu vernachlässigen sind.

### **6.4 Diskussion der Methodik**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung. Hierbei dienten 53BP1-Foci als Marker für die DSBs. Juvenile Mäuse wurden ab ihrem 8. Lebenstag zwischen ein und vier Wochen an je 5 aufeinander folgenden Tagen (Montag - Freitag) fraktioniert mit 100 mGy Ganzkörper bestrahlt (s. 4.2.2). Erstmals in der Arbeitsgruppe wurden die Mäuse mit einer Fixierlösung perfundiert, bevor das Gehirn entnommen und in Formalin fixiert wurde (s. 4.2.3.1). 53BP1 wurde in Gehirnschnitten mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und die resultierenden Foci manuell am Lichtmikroskop ausgezählt (s. 4.2.3.5). Im Folgenden wird die angewandte Methodik diskutiert.

#### **6.4.1 Das in vivo Modell Maus**

Im Vergleich zu Zellkulturen zeigen die Ergebnisse von lebenden Tieren einen geringeren Hintergrundlevel an DNA-Schäden. Dadurch kann die Sensitivität, DSBs nachzuweisen, gesteigert werden (Woodbine L et al., 2015). Die Entwicklung von Strahlenschäden kann zudem durch das Zusammenspiel des Parenchyms, des Bindegewebes, der Gefäßversorgung und der immunologischen Reaktion beeinflusst werden (Wannenmacher M et al., 2013). Das verwendete Mausmodell erlaubt es, die Zellen in diesem natürlichen Mikroumfeld zu untersuchen (Schuler N et Rube CE, 2013). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass sich die Aktivität von Reparaturkomponenten (DNA-PK) zwischen Zellen von Mäusen und Menschen unterscheidet (Finnie NJ et al., 1995).

#### **6.4.2 Bestrahlung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung der juvenilen Mäuse. Danach wurden neben dem Gehirn Herz, Hoden und Lunge entnommen und fixiert.

Casafont I et al. bestrahlten nur den Kopf ihrer Versuchstiere (Casafont I et al., 2011). In der klinischen Strahlentherapie wird das Zielvolumen möglichst genau konturiert und normales Gewebe weitestgehend geschont. Die gewählte homogene Ganzkörperbestrahlung entspricht folglich nicht der klinischen Situation (Thariat J et al., 2013). Demgegenüber konnten in der vorliegenden Arbeit außer dem Gehirn gleichzeitig weitere Gewebearten für andere Untersuchungen der Arbeitsgruppe aus nur einer Maus gewonnen werden, wodurch die Versuchstierzahl niedrig gehalten werden konnte. Schanz S et al. führen darüber hinaus an, dass durch die Ganzkörperbestrahlung eine definierte Dosis im Zielvolumen gewährleistet

werden kann (Schanz S et al., 2012). Der aktuelle Wissensstand über die Reparatur von DSBs beruht überwiegend auf Untersuchungen nach einer einmalig hochdosierten Bestrahlung (Ahmed EA et al., 2012; Rodier F et al., 2011). Klinische relevant für die Strahlentherapie ist jedoch die fraktionierte Applikation der Dosis (Seeber S et Schütte S, 1998; Wannemacher M et al., 2013). Die Auswirkungen auf fraktioniert bestrahltes gesundes Gewebe außerhalb des eigentlichen Zielvolumens sind weitestgehend noch nicht erforscht (Boice JD Jr, 2012). Sie wurden mit der in der vorliegenden Arbeit gewählten Niedrigdosisbestrahlung nachgebildet.

### **6.4.3 Intrakardiale Formalin-Perfusion**

Die Fixation der Gewebe fand erstmals in der Arbeitsgruppe zusätzlich mit der intrakardialen Perfusion statt. Die Tiere wurden betäubt, der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. In den schlagenden linken Ventrikel wurde die Fixierlösung eingebracht (s. 4.2.3.1). Eine Gewebepenetration von 1 mm/h gilt als Richtwert für neutral gepuffertes Formalin (Howat WJ et Wilson BA, 2014). Daher können kleine Gewebestücke nach Gage GJ et al. als Ganzes, das heißt ohne vorangegangene Formalin-Perfusion, in die Fixierlösung eingebracht und dadurch konserviert werden. Bei größeren Proben, wie dem intakten Gehirn, werden bei dieser Art der Fixation aber nicht alle Bereiche des Gewebes gleichartig erreicht. Oftmals beginnen deshalb Veränderungen durch Hypoxie, bevor das Gewebe konserviert werden kann (Gage GJ et al., 2012). Der Vorteil, die Fixierlösung im Rahmen der vorliegenden Arbeit direkt in das Gefäßsystem einzubringen, liegt darin, dass dadurch jeder Bereich des Körpers vergleichsweise schnell erreicht wird (Gage GJ et al., 2012). Nachteilig war der zusätzliche Zeitaufwand.

Die Bildung der 53BP1-Foci in Neuronen wurde in vorangegangenen Studien mit und ohne Formalin-Perfusion untersucht (Casafont I et al., 2011; Schanz S et al., 2012; Suberbielle E et al., 2013). In diesen Studien war eine quantitative Erfassung der 53BP1-Foci in den größeren Gehirnen adulter Mäuse auch ohne die Perfusion möglich (Schanz S et al., 2012). Eine Hauptursache der unterschiedlichen Reproduzierbarkeit immunologischer Färbungen ist jedoch die Gewebefixation. Verzögerte Fixation führt zu einem gesteigerten proteolytischen Abbau. Sie kann eine schwache bis fehlende Färbung sowie das unspezifische Binden von primär beziehungslosen Molekülen hervorrufen (Werner M et al., 2000). Werden die Mäuse nicht mit Formalin perfundiert, so braucht es Zeit, bis die Gewebe entnommen und fixiert werden können. Rube et al. halten einen Verlust der Foci während dieser Zeit für möglich (Rube CE et al., 2011). Diesem sollte mit der Perfusion entgegengewirkt werden. Ein

Vergleich der Perfusion mit einer Kontrolle fand in der vorliegenden Arbeit nicht statt. Es kann nicht beurteilt werden, ob die Fixation besser als die bisherige Methode ohne Perfusion ist. Torres et al. verglichen intrakardial perfundierte Tiere ( $n = 2$ ) mit Tieren, die erst 4 Stunden nach ihrem Tod fixiert wurden ( $n = 4$ ). Zudem wurden Neurone aus Gehirnen verstorbener Männer ( $n = 3$ ) in einem Intervall von 5 bis 21,5 Stunden post mortem untersucht. Es konnte kein Unterschied der 53BP1 Expression und der Markierung der DSBs durch 53BP1 nachgewiesen werden (Torres G et al., 2015). Die Aussagekraft ist jedoch aufgrund der geringen Fallzahl stark eingeschränkt. Sollten sich die Ergebnisse von Torres G et al. in größeren Kollektiven bestätigen (Torres G et al., 2015), ist die Perfusion im Hinblick auf die Focuszahl entbehrlich. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Studien wird zukünftig ein einheitliches Verfahren anzustreben sein (Werner M et al., 2000).

### 6.4.4 Fixation mit Formalin

In der vorliegenden Arbeit wurden Formalin-fixierte Gewebeschnitte untersucht. Formalin konserviert die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen (Howat WJ et Wilson BA, 2014). Die Auswertung konnte dadurch zeitlich unabhängig vom der Gewebeentnahme nach Bestrahlung erfolgen. Durch Formalin ist die Bildung von käfigartigen Calcium-Komplexen während der Fixation beschrieben. Sie werden unter anderem für eine variable Maskierung von Epitopen verantwortlich gemacht. Durch Hitze kann in Anwesenheit von Calciumchelatoren – in dieser Arbeit Citrat – die Antigenität der Proteine wiederhergestellt werden (Antigen Retrieval). Antigen Retrieval ist nach Leong TY et Leong AS für die Reproduzierbarkeit der Färbung ein entscheidender Faktor (Leong TY et Leong AS 2007). Eine Gegenüberstellung vorangegangener Arbeiten zeigt vergleichbare Ergebnisse von Formalin-fixierten und schockgefrorenen Gewebeschnitten (Le O et al., 2010; Schanz S, 2014). Die Fixation mit Formalin und das Antigen Retrieval mit Hitze, wie sie in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, können somit nicht als Ursache für abweichende Ergebnisse herangezogen werden.

53BP1 wurde in der vorliegenden Arbeit mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Woodbine L et al. stellten aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität verwendeter Antikörper geringe Abweichungen der Focuszahl/Neuron fest (Woodbine L et al., 2015). Die Vergleichbarkeit innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde gewährleistet, indem für die quantitative Erhebung immer gleiche Antikörper verwendet wurden. Fluoreszierende Proteine ermöglichen es ohne Antikörper, die Reparatur in lebenden Zellen zu untersuchen. Schettino G et al. behaupteten, die Genauigkeit der Messung dadurch zu verbessern (Schettino G et al.,

2011). Krawczyk PM et al. konnten beispielsweise durch Untersuchung von lebenden Zellen eine Mobilität der Foci darstellen (Krawczyk PM et al., 2012). Die Focusbildung ist darüber hinaus ein dynamischer Prozess. Foci können in lebenden Zellen auch Stunden nach Bestrahlung entstehen und verschwinden. Die Betrachtung fixierter Zellen kann dieser Dynamik nicht gerecht werden (Oka Y et al., 2011). Mit Hilfe der fluoreszierenden Fusionsproteine können dieselben Zellen vor und nach Bestrahlung untersucht werden (Asaithamby A et Chen DJ 2009). Einschränkend besteht der Verdacht, dass das verwendete Laserlicht bei der Untersuchung lebender Zellen einen oxidativen Stresslevel erzeugt. Dieser Einfluss kann mit den fixierten Zellen der vorliegenden Arbeit vermieden werden (Grudzinski S et al., 2010). Den Einfluss des Laserlichts ausschließen zu können ist vorteilhaft, da die potentiell entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies an der Bildung von DSBs beteiligt sind (s. 2.3.2, Wannemacher M et al., 2013) und in der vorliegenden Arbeit die DSBs markierenden 53BP1-Foci (Schultz LB et al., 2000) erfasst wurden.

### **6.4.5 Lichtmikroskopische Quantifizierung der Foci**

Im Folgenden wird zuerst die lichtmikroskopische Auswertung der Foci mit vorhergehenden Verfahren zur Detektion von DSBs vergleichend diskutiert (s. 6.4.5.1). Eine Diskussion des in dieser Arbeit angewandten manuellen Auszählens gegenüber Computer-basierenden Verfahren schließt daran an (s. 6.4.5.2). Die Lichtmikroskopie wird der Transmissionselektronenmikroskopie gegenübergestellt (s. 6.4.5.3). Das mögliche zukünftige methodische Vorgehen wird skizziert.

#### **6.4.5.1 Lichtmikroskopische Quantifizierung der Foci – Pulsfeldgelelektrophorese**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung erforscht. Vor der immunfluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Foci basierte die Analyse der Reparatur von DSBs auf Techniken wie der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), die hohe Strahlungsdosen voraussetzen. Folglich waren diese Untersuchungen auf *in vitro* Studien beschränkt. Demgegenüber erlaubten die Foci-basierenden Verfahren erstmals die Untersuchung der Entstehung und der Reparatur der DSBs einzelner Zellen nach therapeutisch relevanten Niedrigdosen (Raths A et al., 2008). Da die PFGE die DNA frei von Proteinen benötigt, ist keine Untersuchung von DNA-Chromatin-Wechselwirkungen möglich (Rübe CE et al., 2011). Die genutzte Immunfluoreszenzmikroskopie stellt demgegenüber Chromatinmodifikationen dar. Ein direkter Nachweis der DSBs erfolgt nicht (Kinner A et al., 2008). Im Gegensatz zur PFGE können aber DSBs in bestimmten Bereichen (z.B. in Heterochromatin) erfasst werden (Noon

AT et al., 2010). Mit Hilfe des NEHJ Proteins pKu70 können beispielsweise DSBs im Heterochromatin und im Euchromatin erfasst werden. 53BP1 markiert dagegen DSBs überwiegend im Heterochromatin (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Rube CE et al., 2011).

### 6.4.5.2 Manuelles Auszählen – Computer-basiertes Verfahren

Die Auswertung der 53BP1-Foci erfolgte durch den Untersucher am Okular des Lichtmikroskops. Ein Kritikpunkt bei der manuellen Auswertung ist die Subjektivität der Methode (Rothkamm K et al., 2015). Deshalb wurden die Proben mit Nummern kodiert und verblindet ausgewertet. Unbestrahlte Kontrollen wurden mit einbezogen, da Färbungsqualität und die Abbildungseigenschaft das Auszählen beeinflussen können. Dadurch kann nach Rothkamm K et al. die Validität und die Reproduzierbarkeit verbessert werden (Rothkamm K et al., 2015).

Computer-basierende Auszählverfahren wurden in anderen Studien alternativ genutzt (Asaithamby A et Chen DJ 2009; Groesser T et al., 2011; Ivashkevich AN et al., 2011; Marková E et al., 2007; Su Y et al., 2010). Ihre Etablierung ist jedoch sehr aufwendig. Die Resultate sind hoch abhängig von den Werten der gewählten Parameter. Eine Erläuterung der gewählten Werte fehlt oft. Zudem lassen sich subjektive Einflüsse bei der Etablierung nicht vollständig vermeiden (Ivashkevich AN et al., 2011). Das in der vorliegenden Arbeit angewandte manuelle Auszählen gilt als das zuverlässigste Verfahren. Es ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv. Ein etabliertes Computer-basierendes Verfahren ist dagegen schnell (Ivashkevich AN et al., 2011). Es erlaubt darüber hinaus *in vitro* das automatisierte Auffinden und Auswerten derselben lebenden Zellen vor und nach Bestrahlung. Dadurch lassen sich die Foci, die durch Strahlung entstanden sind, von den präexistenten unterscheiden (Asaithamby A et Chen DJ 2009). Dies war in der vorliegenden Arbeit zum einen durch das Verwenden der konservierten Schnitte nicht möglich, zum anderen ist das manuelle Wiederfinden von Zellen nicht sicher realisierbar. Ferner basiert das Verfahren zum Wiederfinden der Foci aus der Literatur auf Zellkulturen (Asaithamby A et Chen DJ 2009). Das Ziel dieser Arbeit war es jedoch, die Entwicklung der mit 53BP1-Foci markierten DSBs nach fraktionierter Bestrahlung *in vivo* zu untersuchen. Die sich daraus ergebenden Vorteile wurden bereits diskutiert (s. 6.4.1). Zwischen der manuellen und der Computer-basierenden Auswertung existiert der Literatur nach ein maximaler Unterschied von 15-20 % (Marková E et al., 2007; Su Y et al., 2010). Beide Methoden korrelieren gut miteinander. Das Auszählen der Foci ist folglich als relative Methode zu nutzen (Ivashkevich AN et al., 2011). Das heißt,

strahlungsbedingte Erhöhungen der Focuszahl unterschiedlicher Studien sind im Verhältnis zu deren Kontrolle zu bewerten, die Entwicklung zwischen Ergebnissen innerhalb einer Arbeit können aufgrund der gleichbleibenden Schwelle direkt verglichen werden. Der Grund dafür ist, dass die Linearität der Focuszahl gegenüber der Dosis bei unterschiedlichen Schwellenlevels erhalten bleibt (Ivashkevich AN et al., 2011). Das heißt, die relative Entwicklung wird durch verschiedene Schwellenlevels nicht beeinflusst. Ein Computer-basierendes Verfahren kann zwar weitgehend unabhängig vom Untersucher verlässliche Ergebnisse liefern (Ivashkevich AN et al., 2011), in Zukunft wird dennoch das manuelle Auszählen – wie es in dieser Arbeit angewandt wurde – als Standard zu nutzen sein, da es bislang das zuverlässigste Verfahren darstellt (Ivashkevich AN et al., 2011).

### **6.4.5.3 Lichtmikroskopie – Transmissionselektronenmikroskopie**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lichtmikroskopie eingesetzt. Andere Studien nutzten die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Sie hat eine höhere Auflösung als die Lichtmikroskopie. Einzeln markierte Proteine können dargestellt werden (Lorat Y et al., 2012; Rübe CE et al., 2011). Die Lichtmikroskopie stellt Proteine dagegen nur als Focus dar, wenn sie in einer genügend großen Anzahl zusammengelagert sind (Lorat Y et al., 2012). Mit Hilfe der TEM kann deren genaue Verteilung im Zellkern dargestellt werden (Dellaire G et al., 2009; Lorat Y et al., 2012). Die TEM ist sensitiver (Rübe CE et al., 2011) und erlaubt die Unterscheidung in elektronendichtes Heterochromatin und weniger elektronendichtes Euchromatin (Schanz S et al., 2012). Nahe benachbart liegende Foci können dagegen lichtmikroskopisch als ein Focus erscheinen, wodurch ihre Anzahl unterschätzt wird (Ugenskiene R et al., 2009).

Mit der Lichtmikroskopie können lebende Zellen durch Fusion von 53BP1 mit einem fluoreszierenden Protein untersucht werden (Asaithamby A et Chen DJ 2009; Jakob B et al., 2009). Die Ergebnisse der TEM entstehen demgegenüber aus Schnittbildern der Kerne und folglich aus toten Zellen. Die Anzahl der DSBs einer Zelle muss auf den gesamten Kern hochgerechnet und damit unter theoretischen Überlegungen geschätzt werden (Lorat Y et al., 2012; Rübe CE et al., 2011). Mit der in dieser Arbeit verwendeten Lichtmikroskopie wurden hingegen alle Ebenen eines Zellkerns dargestellt und in ihnen Foci detektiert. Casafont I et al. zeigten lichtmikroskopisch, dass persistierende Foci vorzugsweise in bestimmten Kompartimenten des Zellkerns zu finden sind (Casafont I et al., 2011). Das heißt, bei der Hochrechnung der Anzahl der DSBs eines Anschnitts im Rahmen der TEM (s.o., Lorat Y et al., 2012; Rübe CE et al., 2011) kann es zu einem systematischen Fehler kommen, da der

untersuchte Anschnitt durch die Verteilung auf bestimmte Kompartimente (Casafont I et al., 2011) nicht repräsentativ für die Anzahl der DSBs innerhalb des gesamten Kerns sein muss. In der vorliegenden Arbeit wurden persistierende Foci untersucht, daher ist der Vorteil, alle Ebenen erfassen zu können von zentraler Bedeutung. Zudem beruhen die TEM Ergebnisse auf der Auswertung von 50 oder weniger Zellkernanschnitten (Dellaire G et al., 2009; Lorat Y et al., 2012; Rube CE et al., 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können sich auf die Auswertung mehrerer hundert Zellen stützen.

Gegenstand zukünftiger Untersuchungen könnte der ultrastrukturelle Aufbau der in der vorliegenden Arbeit erfassten Foci sein. Der Literatur nach unterscheidet sich nämlich der transmissionselektronenmikroskopisch darstellbare Aufbau der Foci bis 24 h post-IR von demjenigen der 48-72 h post-IR persistierenden Foci (Lorat Y et al., 2012). Die TEM stellt einzelne 53BP1-Proteine jeweils als bead dar. Während das Korrelat der lichtmikroskopischen 53BP1-Foci in der TEM bis 24 h post-IR kleine Ansammlungen (Cluster) aus 3-5 53BP1-beads sind, finden sich 48-72 h post-IR große Cluster aus  $\geq 10$  53BP1-beads (Lorat Y et al., 2012). Es ist unklar, wie sich die Gesamtzahl der 53BP1-Proteine in diesen Clustern zu Zeitpunkten  $>72$  h nach der fraktionierten Bestrahlung in den Neuronen der juvenilen Mäuse entwickelt. Würde die Gesamtzahl aller 53BP1 innerhalb der Cluster während der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Abnahme der Focuszahl konstant bleiben, wäre das ein Hinweis dafür sein, dass die DSBs nicht repariert wurden, sondern entsprechend dem Modell der Reparaturzentren zusammengelagert wurden (Neumaier T et al., 2012). Zudem kann mit der TEM untersucht werden, ob sich bei den fraktioniert bestrahlten juvenilen Mäusen Reparaturkomponenten des NHEJ wie pKu70 Proteine (diese bilden lichtmikroskopisch keine Foci) in den Ansammlungen von 53BP1, die den persistierenden Foci zugrunde liegen, nachweisen lassen (Lorat Y et al., 2012). Dadurch könnten weitere Hinweise dafür gefunden werden, ob es sich bei den persistierenden Foci der vorliegenden Arbeit um DSBs handelt.

### **6.4.6 Bedeutung der persistierenden Foci**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die 53BP1-Focuszahl im gesamten Beobachtungszeitraum (72h post-IR – 6 Monate post-IR) nach der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung erhöht war (s. 5.3.2).

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich zwei Arten der 53BP1-Foci unterscheiden lassen. Es existieren kleine transiente und große persistierende Foci (Casafont I et al., 2011; Rodier F et al., 2011). Der Großteil der Foci verschwindet 6-72 Stunden post-IR (Rodier F et al., 2011; Saha S et al., 2014; Schanz S et al., 2012; Woodbine L et al., 2015). Währenddessen nimmt

die Größe der persistierenden Foci zu (Marková E et al., 2007; Rodier F et al., 2011). Eine Hypothese ist, dass die Größenzunahme durch das Zusammenlagern der DSBs entsteht (Marková E et al., 2007). Neumaier T et al. beobachteten eine Erhöhung der Focuszahl bei steigender Dosis, aber abweichend von einem linearen Zusammenhang beider Variablen eine Abnahme der Focuszahl im Verhältnis zur Dosis (Focuszahl/Gy). Eine höhere Strahlendosis führte nicht zu größeren Foci, aber zu einer gesteigerten Intensität der Foci. Sie erklärten dieses Phänomen mit dem Modell der Reparaturzentren. In einem Reparaturzentrum lagern sich mehrere DSBs zusammen. Die längere Persistenz dieser Foci resultiere aus der höheren Anzahl zu reparierenden DSBs (Neumaier T et al., 2012). Während die Foci unmittelbar nach der Bestrahlung unter Aussparung des Nucleolus gleichmäßig über den Kern verteilt sind (Casafont I et al., 2011), finden sich persistierende Foci bevorzugt nahe am Nucleolus und im Randbereichen des Zellkerns (Casafont I et al., 2011; Mata-Garrido J et al., 2016). Am Ort der persistierenden Foci erfolgt im Gegensatz zum unmittelbar angrenzenden Chromatin keine Transkription (Mata-Garrido J et al., 2016). Die Autoren gehen davon aus, dass diese Verlagerung notwendig ist um die Stabilität des Genoms zu sichern (Casafont I et al., 2011; Mata-Garrido J et al., 2016). Die Genstilllegung könnte helfen, die Synthese veränderter Proteine zu verhindern. Gleichzeitig ist das Chromatin unmittelbar am Ort der Foci weniger dicht verpackt und macht die DNA damit einer weiteren Reparatur zugänglich (Mata-Garrido J et al., 2016).

Eine Reihe von Ergebnissen stellt in Frage, dass es sich bei den persistierenden Foci um unreparierte DSBs handelt (Marková E et al., 2007): **(I)** DSBs können mit der PFGE nicht mehr nachgewiesen werden, obwohl die Focuszahl erhöht bleibt (Marková E et al., 2007). **(II)** Die anfängliche Kollokalisierung von 53BP1 mit dem DSB-Marker  $\gamma$ H2AX ist mit zunehmender Dauer nach Bestrahlung stark reduziert (Marková E et al., 2011). **(III)** Lichtmikroskopisch findet sich kein Anhalt für eine aktive Reparatur durch die Homologe Rekombination (Rodier F et al., 2011). **(IV)** Untersuchungen mit der TEM zeigen, dass 53BP1 zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung (20 min post-IR - 24 h post-IR) in kleinen Clustern bestehend aus wenigen 53BP1-Proteinen akkumuliert (Lorat Y et al., 2012; Rube CE et al., 2011). Diese Cluster finden sich überwiegend im Heterochromatin. Das NEHJ Protein pKu70 bindet hingegen DSBs in Heterochromatin und im Euchromatin (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Rube CE et al., 2011). Nach 24 bzw. 72 Stunden sind die pKu70-Cluster nicht mehr zu detektieren, während die 53BP1-Cluster persistieren. Lorat Y et al. gingen folglich von einer abgeschlossenen Reparatur aus (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015). Demnach könnten die persistierenden Foci dauerhafte Chromatinveränderungen nach

unvollständiger oder fehlerhafter Reparatur darstellen (Lorat Y et al., 2012; Schanz S et al., 2012). Die fehlende Kolo-kalisation von  $\gamma$ H2AX oder von Reparaturproteinen (RPA70, pKu70) mit den 53BP1-Foci (s.o., Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Marková E et al., 2011; Rodier F et al., 2011) kann aber nicht als sicheres Zeichen dafür gewertet werden, dass diese 53BP1-Foci nicht weiterhin – wie <24 h post-IR (Schultz LB et al., 2000) – DSBs markieren. Zudem ist die Sensitivität der PFGE mit einer Nachweisgrenze für DSBs von  $\geq 1$ Gy gering (Whitaker SJ et al., 1991). Die fehlende Nachweisbarkeit von DSBs durch die PFGE (s.o., Marková E et al., 2007) hat daher hinsichtlich Foci-markierter DSBs nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Die Tatsache, dass 53BP1 nur nach DSBs im Heterochromatin zu finden ist (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015; Rube CE et al., 2011), schränkt die Bewertung des persistierenden DNA-Schadens bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ein, da der Literatur nach die DSBs im Euchromatin (markiert durch pKu70) zu den untersuchten Zeitpunkten ( $\geq 72$  h post-IR) bereits repariert sind (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015). Während sich der Literatur nach 24 h post-IR bzw. 72 h post-IR keine pKu70 Cluster mehr nachweisen lassen (Lorat Y et al., 2012; Lorat Y et al., 2015), konnte in der vorliegenden Arbeit der verbliebene DNA-Schaden auch 6 Monate post-IR durch eine erhöhte Anzahl von 53BP1-Foci nachgewiesen werden.

### 6.5 Klinische Relevanz

DSBs, die sich mit Hilfe von 53BP1-Foci markieren lassen (Schultz LB et al., 2000), stellen die entscheidende radiobiologische Läsion durch Strahlung dar (Goodhead DT, 1994). Dem LNT-Modell der ICRP entsprechend beeinflusst allein die Dosis das stochastische Risiko nach Bestrahlung (siehe Einleitung, ICRP, 2007; ICRP, 2016). Demzufolge wäre unabhängig vom Alter eine vergleichbare Entwicklung DSB-induzierter Foci bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit wie bei den adulten Mäusen aus der Literatur zu erwarten.

Wie bereits diskutiert (s. 6.1.2), unterscheiden sich jedoch die Akkumulation von DSBs sowie die Auswirkungen der Dosis auf diese Akkumulation bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit von jenen der ebenfalls fraktioniert bestrahlten adulten Mäuse aus der Literatur (Schanz S et al., 2012, Schanz S, 2014): Bei den juvenilen Mäusen akkumulierten weniger DSBs als bei den adulten Mäusen. Mit zunehmender Dosis näherte sich aber die Anzahl der persistierenden DSBs derjenigen der adulten Mäuse aus der Literatur an (s. 6.1.2, Schanz S et al., 2012, Schanz S, 2014). Das Alter zum Zeitpunkt der fraktionierten Bestrahlung ist demnach ein wichtiger Faktor für die Reparatur von DSBs (s. 6.1.2).

Bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit stieg die Anzahl der DSBs 72h nach fraktionierter Bestrahlung mit der zunehmender Dosis linear an (s. 5.3.1). Hierbei zeigte sich eine Übereinstimmung mit dem LNT-Modell, das eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Strahlendosis und einem möglichen Strahlenschaden voraussagt (s. 2.2, ICRP, 2007; ICRP, 2016).

Die Dauer der Persistenz von Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung ähnelt bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit aber jener der einmalig höher dosiert bestrahlten adulten Mäuse aus der Literatur (6.2.2, Le O et al., 2010). Hierbei unterscheidet sie sich deutlich von jener der ebenfalls fraktioniert bestrahlten adulten Mäuse aus der Literatur (6.2.1, Schanz S, 2014). Damit ist anzunehmen, dass die Schwere des Strahlenschadens langfristig derjenigen adulter Mäuse, die mit einer höheren Dosis bestrahlt wurden (Le O et al., 2010), gleicht (s. 6.2.2). Dies widerspricht der allein auf der Dosis basierenden Theorie des LNT-Modells (s.o.).

Nachfolgend wird diskutiert, dass die lange Persistenz der 53BP1-Foci in den juvenilen Gehirnen, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, mit möglichen neurodegenerativen Langzeitfolgen der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung in Zusammenhang stehen könnte. Eine Reihe von Erkrankungen (Ataxia Teleangiectasia, Ataxia Teleangiectasia like disease, Nijmegen breakage syndrome), die Defekte in der Reparatur von DSBs aufweist, ist nämlich mit neurologischen Einschränkungen assoziiert (Madabhushi R et al., 2014). Auch die Neurone von Alzheimerpatienten zeigten im Vergleich zu denjenigen gesunder Menschen mehr DNA-Schäden (Adamec E et al., 1999). Im Mausmodell dieser neurodegenerativen Erkrankung ließ sich - wie auch in der vorliegenden Arbeit - eine erhöhte Anzahl von 53BP1-Foci nachweisen (Suberbielle E et al., 2013). Oftmals zeigten die Studien nur eine Korrelation aber keinen Kausalzusammenhang zwischen den DSBs und neurologischen Einschränkungen. Dennoch bieten Defekte der Reparatur von DSBs und deren Akkumulation eine mögliche Erklärung für neurodegenerative Folgen (Madabhushi R et al., 2014). Hervorzuheben ist, dass die langfristige Abnahme des IQ bei Kindern nach kranialer Bestrahlung umso stärker ausgeprägt war, je jünger die Kinder zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren. Der Effekt des Alters zum Zeitpunkt der Bestrahlung auf den IQ überwog den Effekt der Dosis (Merchant TE et al., 2009). Die lange Persistenz der Foci bei den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit verglichen mit derjenigen adulter Mäuse aus der Literatur (Schanz S, 2014) deutet ebenfalls eine gesteigerte Vulnerabilität des juvenilen Gehirns im Langzeitverlauf nach fraktionierter Bestrahlung an (s. 6.2 und 6.3).

Diese wird wiederum durch die rein dosisbasierte Risikobewertung des LNT-Modells (s.o., ICRP, 2007; ICRP, 2016) nicht adäquat beschrieben.

### **6.6 Ausblick**

Durch den Nachweis der erhöhten Anzahl persistierender Foci liefert die vorliegende Arbeit einen Hinweis, dass bei Kindern selbst die niedrigen Dosen, wie sie im Randbereich der Zielvolumina durch den Einsatz hochkonformaler Bestrahlungstechniken auftreten (Hall EJ et Wuu CS, 2003), nicht zu vernachlässigen sind. In Neuronen ist dies von besonderer Bedeutung, da sie postmitotisch sind und daher nicht durch Zellteilung ersetzt werden können (Kornack DR et al., 2001). Weitere Erkenntnisse über die Entwicklung von Strahlenschäden sind wichtig, da das von der Internationalen Strahlenschutzkommission (ICRP) verwendete LNT-Modell zur Risikoabschätzung eines stochastischen Strahlenschadens (ICRP, 2007; ICRP, 2016; Sanders CL, 2009) die Unterschiede zwischen den juvenilen Mäusen der vorliegenden Arbeit und den adulten Mäusen aus der Literatur nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung nicht erklären kann (s. 6.5). Der hohe Anteil der Langzeitüberlebenden Kinder (Kaatsch P et Spix C, 2015) unterstreicht die Notwendigkeit den Hintergrund und die möglichen Folgen der in der vorliegenden Arbeit beobachteten erhöhten 53BP1-Focuszahl näher zu untersuchen. Eine neurophysiologische Testung gleichartig bestrahlter juveniler Mäuse könnte helfen, den möglichen Zusammenhang zwischen den persistierenden Foci und neurodegenerativen Langzeitfolgen aufzudecken.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

(I)RIF	(Ionizing) radiation-induced foci
53BP1	p53-Binding Protein 1
a-NHEJ	Alternatives Nicht-homologes Endjoining
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
c-NHEJ	Klassisches Nicht-homologes Endjoining
CNS	central nervous system
d	Tag
DNA	englisch für Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Protein Kinase
DNA-PKcs	DNA-Protein Kinase catalytic subunit
DSB	Doppelstrangbruch
DSBs	Doppelstrangbrüche
dsDNA	doppelsträngige DNA
h	Stunde
H2AK15ub	an Lysin 15 ubiquitiniertes Histon H2A
H4K16ac	an Lysin 16 acetyliertes Histon H4
H4K20me2	an Lysin 20 dimethyliertes Histon H4
HDAC1 und HDAC2	Histondeacetylase 1 und 2
HR	Homologe Rekombination
ICRP	Internationale Strahlenschutzkommission
IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
IQ	Intelligenzquotient
JMJD2A	Jumonji domain-containing protein 2A
KAP-1	KRAB-associated protein 1
KG	Körpergewicht
LIG4	DNA ligase 4
LNT	Linear-Non-Threshold
LSS	Life Span Study
m	Monat
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MMSET	Histon-Methyltransferase "multiple myeloma SET domain-containing protein"
n	Anzahl

NHEJ	Nicht-homologes Endjoining
PBS	englisch für Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pmin	kleinstes p
post-IR	nach Bestrahlung
RNF168	Ring finger protein 168
RNF8	Ring finger protein 8
RPA	Replication protein A
SETD8	SET domain-containing protein 8
ssDNA	einzelsträngige DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\gamma$ H2AX	phosphorylierte Histonvariante H2AX

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Einfluss neuer Bestrahlungstechniken in der Radioonkologie.....	5
Abbildung 2.2 LNT Modell und mögliche Beziehung von Strahlungs-dosis zu Krebsrisiko....	7
Abbildung 2.3 DNA und Chromatin .....	8
Abbildung 2.4 DNA- Reparaturwege.....	12
Abbildung 2.5 Modell der Anlagerung des 53BP1 in DSB Nähe.....	15
Abbildung 4.1 Bestrahlungsplan .....	23
Abbildung 4.2 Perfusion .....	24
Abbildung 5.1 Darstellung der kortikalen Neuronen .....	28
Abbildung 5.2 53BP1-Focuszahl – Zunahme mit steigender Dosis .....	29
Abbildung 5.3 53BP1-Focuszahl in den kortikalen Neuronen juveniler Mäuse.....	30
Abbildung 5.4 Übersichtsaufnahmen des zerebralen Kortex.....	32
Abbildung 5.5 53BP1 Focuszahl – Langzeitentwicklung nach fraktionierter Bestrahlung.....	33
Abbildung 5.6 Anteil der Neurone mit mindesten einem 53BP1-Focus.....	35
Abbildung 5.7 Focuszahl/Neuron und Anteil der Neurone mit Focus.....	37
Abbildung 6.1 Effektivität der Reparatur.....	41
Abbildung 6.2 Zeitliche Entwicklung von DNA-Schäden nach Bestrahlung.....	47

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Zelluläre DNA-Schäden nach 1 Gy Photonenstrahlung.....	10
Tabelle 4.1 Primärantikörper.....	18
Tabelle 4.2 Sekundärantikörper .....	18
Tabelle 4.3 Geräte und Messinstrumente .....	19
Tabelle 4.4 Verwendete Reagenzien/Lösungen .....	20
Tabelle 4.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 4.6 Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	26
Tabelle 4.7 Verwendete Fluoreszenzfilter .....	26

### 7.4 Literaturverzeichnis

1. Adamec E, Vonsattel JP, Nixon RA (1999) DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Research* 849: 67–77
2. Ahmed EA, Agay D, Schrock G, Drouet M, Meineke V, Scherthan H (2012) Persistent DNA damage after high dose in vivo gamma exposure of minipig skin. *PLoS One* 7:e39521
3. Annunziato AT (2008) DNA Packing: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* 1:26
4. Asaithamby A, Chen DJ (2009) Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Research* 37:3912–3923
5. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of Experimental Medicine* 79:137-158
6. Baltanás FC, Casafont I, Lafarga V, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011) Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *The journal of biological chemistry* 286:28287-28302
7. Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG (2005) Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer* 5:867-875

8. Bindra RS, Wolden SL (2016) Advances in Radiation Therapy in Pediatric Neuro-oncology. *Journal of Child Neurology* 4: 506-516
9. Boice JD Jr (2012) Radiation epidemiology: a perspective on Fukushima. *J. Radiol. Prot.* 32:33–40
10. Bothmer A, Robbiani DF, Di Virgilio M, Bunting SF, Klein IA, Feldhahn N, Barlow J, Chen HT, Bosque D, Callen E, Nussenzweig A, Nussenzweig MC (2011) Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Molecular Cell* 42:319-329
11. Buchwalow IB, Böcker W (2010) *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
12. Calabrese EJ, O'Connor MK (2014) Estimating Risk of Low Radiation Doses – A Critical Review of the BEIR VII Report and its Use of the Linear No-Threshold (LNT) Hypothesis. *Radiation Research* 182:463-474
13. Cannan WJ, Pederson DS (2016) Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J. Cell. Physiol.* 231: 3–14
14. Casafont I, Palanca A, Lafarga V, Berciano MT, Lafarga M (2011) Effect of ionizing radiation in sensory ganglion neurons: organization and dynamics of nuclear compartments of DNA damage/repair and their relationship with transcription and cell cycle. *Acta Neuropathol* 122:481–493
15. Dellaire G, Kepkay R, Bazett-Jones DP (2009) High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin,  $\gamma$ -H2A.X and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci. *Cell Cycle* 8:3750-3769
16. Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J, Lukas J, Lukas C (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136:435-446

17. Finnie NJ, Gottlieb TM, Blunt T, Jeggo PA, Jackson SP (1995) DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:320-324
18. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escribano-Díaz C, Orthwein A, Leung CCY, Huang H, Landry MC, Kitevski-LeBlanc J, Noordermeer SM, Sicheri F, Durocher D (2013) 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499:50-54
19. Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012) Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments*:e3564
20. 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. *Molecular Cell* 31:167-177
21. Goodhead DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65:7-17
22. Groesser T, Chang H, Fontenay G, Chen J, Costes SV, Barcellos-Hoff MH, Parvin B, Rydberg B (2011) Persistence of  $\gamma$ -H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to  $\gamma$ -rays or iron ions. *International Journal of Radiation Biology* 87:696-710
23. Grudzenski S, Raths A, Conrad S, Rube CE, Löbrich M (2010) Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14205-14210
24. Guo CY, Luo L, Urata Y, Goto S, Huang WJ, Takamura S, Hayashi F, Doi H, Kitajima Y, Ono Y, Ogi T, Li TS (2015) Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Scientific reports* 5:8055

25. Hall EJ, Wu CS (2003) Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 56:83-88
26. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374
27. Howat WJ, Wilson BA (2014) Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70:12-19
28. ICRP (2007) The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* 37 (2-4)
29. ICRP (2016) Proceedings of the Third International Symposium on the System of Radiological Protection. *Ann. ICRP* 45 (1S)
30. Ivashkevich AN, Martin OA, Smith AJ, Redon CE, Bonner WM, Martin RF, Lobachevsky PN (2011)  $\gamma$ H2AX foci as a measure of DNA damage: a computational approach to automatic analysis. *Mutation Research* 711:49-60
31. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:6098-6102
32. Jakob B, Splinter J, Durante M, Taucher-Scholz G (2009) Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3172-3177
33. Kaatsch P, Spix C (2015) German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz
34. Kakarougkas A, Ismail A, Klement K, Goodarzi AA, Conrad S, Freire R, Shibata A, Lobrich M, Jeggo PA (2013) Opposing roles for 53BP1 during homologous recombination. *Nucleic Acids Research* 41:9719-9731
35. Kakarougkas A, Jeggo PA (2014) DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *The British Journal of Radiology* 87:20130685

36. Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70:220-233
37. 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 Research* 36:5678-5694
38. Kleiner RE, Verma P, Molloy KR, Chait BT, Kapoor TM (2015) Chemical proteomics reveals a  $\gamma$ H2AX-53BP1 interaction in the DNA damage response. *Nature Chemical Biology* 11:807-814
39. Kornack DR, Rakic P (2001) Cell Proliferation Without Neurogenesis in Adult Primate Neocortex. *Science* 294:2127-2130
40. Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871
41. Krawczyk PM, Borovski T, Stap J, Cijssouw T, ten Cate R, Medema JP, Kanaar R, Franken NAP, Aten JA (2012) Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Science* 125:2127-2133
42. Le O, Rodier F, Fontaine F, Coppe JP, Campisi J, DeGregori J, Laverdière C, Kokta V, Haddad E, Beauséjour CM (2010) Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* 9:398-409
43. Leong TY, Leong AS (2007) How does antigen retrieval work? *Advances in Anatomic Pathology* 14:129-131
44. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (eds) (2006) *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
45. Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012) Beyond Repair Foci: DNA Double-Strand Break Repair in Euchromatic and Heterochromatic Compartments Analyzed by Transmission Electron Microscopy. *PLoS One* 7:e38165

46. Lorat Y, Brunner CU, Schanz S, Jakob B, Taucher-Scholz G, Rube CE (2015) Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET irradiation by quantitative electron microscopy--the heavy burden to repair. *DNA Repair* 28:93-106
47. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389:251-260
48. Madabhushi R, Pan L, Tsai LH (2014) DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* (83): 266-282
49. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical journal* 417:639–650
50. Marková E, Schultz N, Belyaev IY (2007) Kinetics and dose-response of residual 53BP1/γ-H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *International Journal of Radiation Biology* 83:319-329
51. Marková E, Torudd J, Belyaev I (2011) Long time persistence of residual 53BP1/γ-H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology* 87:736-745
52. Mata-Garrido J, Casafont I, Tapia O, Berciano MT, Lafarga M (2016) Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathologica Communications* (4): 41
53. Mattsson S, Nilsson M (2015) On the estimation of radiation-induced cancer risks from very low doses of radiation and how to communicate these risks. *Radiation Protection Dosimetry*:1-5
54. Merchant TE, Conklin HM, Wu S, Lustig RH, Xiong X (2009) Late Effects of Conformal Radiation Therapy for Pediatric Patients With Low-Grade Glioma: Prospective Evaluation of Cognitive, Endocrine, and Hearing Deficits. *Journal of clinical oncology* 27:3691-3697

55. Mulhern RK, Merchant TE, Gajjar A, Reddick WE, Kun LE (2004) Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. *Lancet Oncology* 5:399-408
56. Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, Bouffler S (2009) Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nature Reviews Cancer* 9:596-604
57. Neumaier T, Swenson J, Pham C, Polyzos A, Lo AT, Yang P, Dyball J, Asaithamby A, Chen DJ, Bissell MJ, Thalhammer S, Costes SV (2012) Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:443-448
58. Noon AT, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA (2010) 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biology* 12:177-184
59. Nowosielska A, Marinus MG (2005) Cisplatin induces DNA double-strand break formation in *Escherichia coli* dam mutants. *DNA Repair* 4:773-781
60. Oka Y, Yamauchi M, Suzuki M, Yamashita S, Suzuki K (2011) Persistence and dynamics of DNA damage signal amplification determined by microcolony formation and live-cell imaging. *Journal of Radiation Research* 52:766-774
61. Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi F, Soda M, Grant EJ, Sakata R, Sugiyama H, Kodama K (2012) Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiation Research* 177:229-243
62. Panier S, Boulton SJ (2013) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:7-18
63. Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z, Lou Z (2011) MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* 470:124-128

64. Pryde F, Khalili S, Robertson K, Selfridge J, Ritchie AM, Melton DW, Jullien D, Adachi Y (2005) 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *Journal of Cell Science* 118:2043-2055
65. Raths A, Grudzenski S, Löbrich M (2008) DNA Double-Strand Break Quantification and Localization in Mouse Tissues. *GSI Scientific Report* 2008:366
66. Ren K, Peña de Ortiz S (2002) Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain. *Journal of Neurochemistry* 80:949-959
67. Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppé JP, Campeau E, Beauséjour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science* 124:68-81
68. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273:5858-5868
69. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology* 146: 905–915
70. Ron E, Modan B, Floro S, Harkedar I, Gurewitz R (1982) Mental function following scalp irradiation during childhood. *American Journal of Epidemiology* 116:149-160
71. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S (2015) DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56:491-504
72. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5057–5062

73. 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
74. Saha S, Woodbine L, Haines J, Coster M, Ricket N, Barazzuol L, Ainsbury E, Sienkiewicz Z, Jeggo P (2014) Increased apoptosis and DNA double-strand breaks in the embryonic mouse brain in response to very low-dose X-rays but not 50 Hz magnetic fields. *J. R. Soc. Interface* 11:20140783
75. Sanders CL (2009) Radiation Hormesis and the Linear-No-Threshold Assumption. *Springer Science & Business Media*:3-7
76. Sato K, Imai T, Okayasu R, Shimokawa T (2014) Heterochromatin domain number correlates with X-ray and carbon-ion radiation resistance in cancer cells. *Radiation Research* 182:408-419
77. Schanz S, Schuler N, Lorat Y, Fan L, Kaestner L, Wennemuth G, Rube C, Rube CE (2012) Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA Repair (Amst)* 11:823-832
78. Schanz S (2014) Charakterisierung der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden in Abhängigkeit von der neuronalen Chromatinstruktur. Dissertation, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg(Saar)
79. Schettino G, Ghita M, Richard DJ, Prise KM (2011) Spatiotemporal investigations of DNA damage repair using microbeams. *Radiation Protection Dosimetry* 143:340-343
80. Schuler N, Rube CE (2013) Accumulation of DNA damage-induced chromatin alterations in tissue-specific stem cells: the driving force of aging? *PLoS One* 8:e63932
81. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Cell Biology* 151:1381–1390

82. Seeber S, Schütte S (eds) (1998) *Therapiekonzepte Onkologie*. 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio
83. Sharma S (2007) Age-related nonhomologous end joining activity in rat neurons. *Brain Research Bulletin* 73:48-54
84. Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AMR, Durocher D (2009) The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136:420-423
85. Su Y, Meador JA, Geard CR, Balajee AS (2010) Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Experimental Dermatology* 19:e16-e22
86. Suberbielle E, Sanchez PE, Kravitz AV, Wang X, Ho K, Eilertson K, Devidze N, Kreitzer AC, Mucke L (2013) Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience* 16:613-621
87. Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA (2013) Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 20:317-325
88. Thariat J, Hannoun-Levi JM, Sun Myint A, Vuong T, Gérard JP (2013) Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10:52-60
89. Thorp NJ, Taylor RE (2014) Management of central nervous system tumours in children. *Clinical Oncology* 26: 438-445
90. Tomita M, Maeda M (2015) Mechanisms and biological importance of photon-induced bystander responses: do they have an impact on low-dose radiation responses. *Journal of Radiation Research* 56:205-219

91. Torres G, Leheste JR, Ramos RL (2015) Immunocytochemical localization of DNA double-strand breaks in human and rat brains. *Neuroscience* 290:196–203
92. Tsurumi A, Li WX (2012) Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics* 7:680-688
93. Ugenskiene R, Prise K, Folkard M, Lekki J, Stachura Z, Zazula M, Stachura J (2009) Dose response and kinetics of foci disappearance following exposure to high- and low-LET ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 85:872-882
94. Venkatesh S, Workman JL (2015) Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16:178–189
95. Vyjayanti VN, Rao KS (2006) DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neuroscience Letters* 393:18-22
96. Walter AW, Mulhern RK, Gajjar A, Heideman RL, Reardon D, Sanford RA, Xiong X, Kun LE (1999) Survival and neurodevelopmental outcome of young children with medulloblastoma at St Jude Children's Research Hospital. *Journal of Clinical Oncology* 17:3720-3728
97. Wannemacher M, Wenz F, Debus J (2013) *Strahlentherapie*. 2. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg
98. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737–738
99. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000) Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology* 24:1016–1019
100. Whitaker SJ, Powell SN, McMillan TJ (1991) Molecular assays of radiation-induced DNA damage. *European Journal of Cancer* 27:922-928

101. Williams GJ, Hammel M, Radhakrishnan SK, Ramsden D, Lees-Miller SP, Tainer JA (2014) Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst.)* 17:110–120
102. Woodbine L , Haines J , Coster M, Barazzuol L, Ainsbury E, Sienkiewicz Z, Jeggo P (2015) The rate of X-ray-induced DNA double-strand break repair in the embryonic mouse brain is unaffected by exposure to 50 Hz magnetic fields. *International Journal of Radiation Biology* 91:1-5

## **8 Publikationen**

Es ist geplant, die Daten der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Publikation der Arbeitsgruppe (Labor für Molekulare Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes) über den Einfluss von Strahlung auf die Neurogenese zu veröffentlichen.

## **9 Dank**

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Rube für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung der vorliegenden Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes für die aufgeschlossene Zusammenarbeit bedanken. Für die bereitwillige Einarbeitung bedanke ich mich bei Frau Dr. Stefanie Schanz.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für den verlässlichen Rückhalt und das Ermöglichen meines Studiums einschließlich Dissertation. Ferner danke ich meiner Freundin für ihre stete Unterstützung.

## **10 Lebenslauf**