

Untersuchungen zum immunzytochemischen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in humanen Lymphozyten mittels automatisierter γ H2AX-Analyse

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von **Dipl.-Ing. Annika Reddig** (geb. Willitzki)

geboren am 06. Oktober 1984 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Dirk Reinhold

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan-Heiner Küpper

eingereicht am: 20.06.2016

verteidigt am: 29.11.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Arten und Ursachen von DNA-Schäden	1
1.1.1 Aufbau der DNA und Organisation im Chromatin	1
1.1.2 Ursachen von DNA-Schäden.....	4
1.1.3 DNA-Reparaturmechanismen in eukaryotischen Zellen.....	5
1.1.4 Auswirkungen persistenter DNA-Schäden.....	10
1.2 Analysemethoden zur Genotoxizitätsbestimmung.....	11
1.2.1 Reportersysteme zur Detektion von Genmutationen	12
1.2.2 Zytogenetischer Nachweis von Chromosomenschäden.....	13
1.2.3 Molekularbiologische Analyse von DNA-Schäden	14
1.3 Bedeutung und Nachweis von γ H2AX	17
1.3.1 Das H2AX-Histon und seine Bedeutung für die DSB-Reparatur.....	17
1.3.2 Verfahren zum Nachweis von γ H2AX.....	19
1.4 Chemotherapeutisch induzierte DNA-Schäden und Ursachen für Arzneimittelresistenzen	22
1.4.1 Zytostatikainduzierte DNA-Läsionen.....	22
1.4.2 ABC-Transporter und Arzneimittelresistenzen.....	23
1.5 DNA-Schäden in der medizinischen Radiologie.....	24
1.5.1 Ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung bei der medizinischen Bildgebung....	24
1.5.2 Magnetresonanztomographie	26
2 Zielstellung der Arbeit	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Materialien.....	29
3.1.1 Reagenzien und Chemikalien.....	29

3.1.2	Farb- und Detektionsstoffe, Analyse-Kits	30
3.1.3	Antikörper	30
3.1.4	Pharmakologische Substanzen, Inhibitoren und Mitogene	30
3.1.5	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	30
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	32
3.1.7	Geräte und Software	32
3.2	Methoden	34
3.2.1	Aufreinigung von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut.....	34
3.2.2	Behandlung von MNZ mit pharmakologischen Substanzen	34
3.2.3	Exposition von MNZ gegenüber elektromagnetischer Strahlung.....	34
3.2.4	Immunzytochemische Färbung von γ H2AX-Foci	36
3.2.5	Analyse von γ H2AX-Foci in humanen mononukleären Zellen	37
3.2.6	Durchflusszytometrische γ H2AX-Detektion	40
3.2.7	SDS-PAGE und Western-Blot-basierte γ H2AX-Detektion	41
3.2.8	Zellviabilitätsbestimmung mittels Propidiumiodid-Färbung.....	42
3.2.9	CellTiter-Blue® Viabilitätstest.....	43
3.2.10	[3 H]-Thymidin-Zellproliferationstest	43
3.2.11	Mikronukleus-Test	44
3.2.12	Effluxaktivitätsanalyse des ABC-Transporters P-Glykoprotein	44
3.2.13	Statistische Analysen	45
3.3	Ethikvoten und Probanden	46
3.3.1	Ethikvotum.....	46
3.3.2	Probanden.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Validierung der automatisierten γ H2AX-Focus-Analyse an MNZ von gesunden Blutspendern.....	47
4.1.1	Vergleich zwischen manueller und automatisierter Auswertung des γ H2AX- Immunfluoreszenztests	47
4.1.2	Charakterisierung der automatisierten γ H2AX-Analyse nach dosisabhängiger Induktion von DNA-DSB durch Etoposid	49
4.1.3	Einfluss der analysierten Zellzahl auf die Messgenauigkeit	52
4.2	Vergleich unterschiedlicher Methoden zur γ H2AX-Detektion und Zytotoxizitätsbestimmung	54

4.2.1	Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Etoposid und γ H2AX in MNZ analysiert mittels automatisierter Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Western-Blot-Verfahren	54
4.2.2	Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Propidiumiodid-Einbau und [3 H]-Thymidin-Zellproliferationstest nach ETP-Behandlung	58
4.3	Analysen zur Kinetik Etoposid-induzierter γ H2AX-Foci und deren Reparaturverlauf	60
4.4	Genotoxizitätsanalyse mittels γ H2AX-Assay von unterschiedlichen immunsuppressiven Substanzen	61
4.5	Untersuchungen zur Eignung des γ H2AX-Assays als Chemosensibilitätstest	63
4.5.1	Bestimmung der Effluxaktivität mittels Rhodamin-123	63
4.5.2	Bestimmung der Zytostatikasensibilität mittels γ H2AX-Analyse	65
4.6	Dosisabhängige Zytotoxizität und Induktion von γ H2AX-Foci nach Gammabestrahlung von MNZ	70
4.6.1	Zytotoxische Wirkung von Gammastrahlen auf MNZ	70
4.6.2	Induktion und Reparatur von DNA-DSB nach Gammabestrahlung	70
4.7	Analysen zum genotoxischen Potential der Hochfeld- und Ultrahochfeld-MRT	72
4.7.1	In-vitro-Studie zur Untersuchung von genotoxischen und zytotoxischen Effekten nach 7 T-Ultrahochfeld-MRT	72
4.7.2	Analysen zum Einfluss der statischen Magnetfeldstärke und des Kontrastmittels auf die Induktion von γ H2AX-Foci in MNZ von Patienten nach MRT-Untersuchung	77
4.7.3	Studie zur Untersuchung der DNA-Integrität in MNZ von Probanden mit erhöhter 7 T-MRT-Exposition	82
5	Diskussion	86
5.1	Evaluierung der automatisierten γ H2AX-Analyse	86
5.2	Untersuchungen zur Eignung des γ H2AX-Assays hinsichtlich potentieller klinischer Anwendungen	95
5.3	Untersuchungen zum genotoxischen Potential der (Ultra-)Hochfeld-Magnetresonanztomographie	106
5.4	Ausblick	116

Zusammenfassung	118
Summary	119
Literaturverzeichnis	120
Publikationsliste.....	139
Danksagung	140
Eigenständigkeitserklärung.....	141
Lebenslauf	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Aufbau der DNA und Organisation im Chromatin.....	2
Abb. 1.2: Ursachen und Arten unterschiedlicher DNA-Läsionen sowie vereinfachte Modelle wesentlicher DNA-Reparaturmechanismen humaner Zellen	6
Abb. 1.3: Schematische Darstellung verbreiteter zytogenetischer und molekularbiologischer Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden.....	16
Abb. 1.4: Zelluläre DSB-Schadensantwort und Nachweis von γ H2AX-Foci.....	18
Abb. 1.5: Schematische Darstellung des elektromagnetischen Spektrums	25
Abb. 3.1: Prinzip der automatisierten γ H2AX-Auswertung.....	39
Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Bestimmung der γ H2AX-Intensität.....	41
Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Zellviabilitätsbestimmung nach PI-Färbung	43
Abb. 4.1: Vergleich zwischen manueller und automatisierter γ H2AX-Focus-Analyse und Einfluss der Z-Ebenenanzahl auf die automatisiert quantifizierten γ H2AX-Foci	48
Abb. 4.2: Automatisierte γ H2AX-Analyse nach dosisabhängiger Induktion von DNA-DSB in MNZ durch ETP-Behandlung über 16 h.....	51
Abb. 4.3: Einfluss der Anzahl an analysierten Zellen auf die Messgenauigkeit.....	52
Abb. 4.4: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der ETP-Konzentration und den γ H2AX-Foci bzw. der γ H2AX-Intensität pro Zelle analysiert mittels automatisierter Mikroskopie	55
Abb. 4.5: Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der ETP-Konzentration und dem γ H2AX-Niveau mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot	56
Abb. 4.6: Vergleich der γ H2AX-Analyse mittels Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Western-Blot	57
Abb. 4.7: Zytotoxizitätsanalyse nach 72- bzw. 1-stündiger ETP-Behandlung.....	59
Abb. 4.8: Kinetikanalysen zur Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci nach ETP- Behandlung.....	60
Abb. 4.9: γ H2AX-Analyse nach Behandlung von MNZ mit Immunsuppressiva	62
Abb. 4.10: Bestimmung der ABC-Transporteraktivität mittels Rhodamin-123-Effluxassay.....	64

Abb. 4.11: Modulierte ETP-Sensibilität von MNZ nach Ko-Inkubation mit CsA bzw. Rapa	65
Abb. 4.12: Modulierte ETP-Sensibilität der MNZ und Induktion von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Konzentration an CsA bzw. Rapa.....	66
Abb. 4.13: Modulierte ETP-Sensibilität der MNZ und Induktion von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	67
Abb. 4.14: Einfluss von CsA und Rapa auf Daunorubicin- und strahleninduzierte DSB.....	68
Abb. 4.15: Einfluss von CsA und Rapa auf die Reparatur ETP- bzw. strahleninduzierter DSB.....	69
Abb. 4.16: Zellviabilität γ -bestrahlter MNZ in Abhängigkeit von der Dosis und Zeit.....	70
Abb. 4.17: Dosisabhängige Induktion und Kinetik strahleninduzierter γ H2AX-Foci.....	71
Abb. 4.18: Durchflusszytometrische γ H2AX-Analyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht-ionisierender und ionisierender Strahlung	73
Abb. 4.19: Mikroskopische γ H2AX-Analyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht-ionisierender und ionisierender Strahlung	75
Abb. 4.20: Zytotoxizitätsanalyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht- ionisierender und ionisierender Strahlung.....	76
Abb. 4.21: Flussdiagramm zur Darstellung der Blutabnahmen und Klassifizierung der verschiedenen Untersuchungsbedingungen in der In-vivo-Studie.....	77
Abb. 4.22: In-vivo-Studie zur Analyse MRT-induzierter γ H2AX-Foci.....	78
Abb. 4.23: In-vivo-Studie zur Analyse MRT-induzierter γ H2AX-Foci – Proben differenziert bezüglich der statischen Magnetfeldstärke und Injektion von Kontrastmittel.....	79
Abb. 4.24: In-vitro-Analyse zur Toxizität des Kontrastmittels Gadovist®	81
Abb. 4.25: Analyse der γ H2AX-Foci in MNZ von Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern.....	83
Abb. 4.26: Analyse der Mikronuklei und Proliferation in MNZ von Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern.....	84
Abb. 4.27: Einfluss der 7 T-MRT auf γ H2AX-Foci in ETP-behandelten MNZ und deren Reparaturkinetik in MRT-exponierten Probanden und Kontrollgruppe	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Einfluss der Anzahl an analysierten Zellen auf die Messgenauigkeit	53
Tabelle 4.2: Energieabsorption bei Anwendung unterschiedlicher MRT-Protokolle und demographische Patientendaten	80

Abkürzungsverzeichnis

¹³⁷ Cs	Radioaktives Caesium-Isotop
³ H-Thymidin	Radioaktiv markiertes Thymidin-Nukleosid
53BP1	p53-binding protein 1
6-4PPs	Pyrimidin 6-4-Photoprodukte
8-OH-dG	8-Hydroxydesoxyguanosin
8-oxo-dG	8-Oxo-2'-Desoxyguanosin
A	Purin-DNA-Base Adenin
ABC-Transporter	Membranständiger Transporter mit ATP-bindende Kasette
AP-Stelle	apurische- bzw. apyrimidinische-Stelle
AraC	Cytarabin
ATM	Ataxia-Telangiectasia-Mutated Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia-Telangiectasia-and-Rad3-related Proteinkinase
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Pyrimidin-DNA-Base Cytosin
C	Kohlenstoff (in Zusammenhang mit Molekülatomen)
CCD	Charge-Coupled Device
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
cpm	Counts pro Minute
CPT	Camptothecin
CsA	Cyclosporin A
CT	Computertomographie
CtIP	C-terminal-binding protein(CtBP)-interacting protein
Da	Dalton
dA	Desoxyadenosin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dC	Desoxycytidin
DEXA	Dexamethason
dG	Desoxyguanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-PK
DNR	Daunorubicin
DSB	Doppelstrangbruch
dT	Desoxythymidin

ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPI	Echo-Planar-Imaging
ETP	Etoposid
EXP	Exponierte Probandengruppe
FCS	Fötale Kälberserum
FDA	US-amerikanischen Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Purin-DNA-Base Guanin
Gy	Einheit der Strahlungsdosis: Gray
H2AX	Variante X des Histons H2A
HR	Homologe Rekombination
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ICNIRP	Internationale Kommission zum Schutz vor nicht-ionisierender Strahlung
KG	Probanden der Kontrollgruppe
KM	Kontrastmittel
LED	Leuchtdiode
Mb	Mega-Basenpaare
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1
MDR	Multidrug-Resistenz
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MNZ	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
MRN	Komplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n. s.	Nicht signifikant
NaF	Natriumfluorid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NG	Nachweisgrenze
NHEJ	Nicht-homologe-Enden-Verknüpfung
NK	Negativkontrolle

OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OvGU	Otto-von-Guericke-Universität
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
P-gp	P-Glykoprotein
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidylinositol-3-Kinase-related-Kinase
Rapa	Rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replication Protein A
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute - Zellkulturmedium
SAR	Spezifische Absorptionsrate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SSC	Seitwärtsstreulicht
STD	Standardabweichung
T	Pyrimidin-DNA-Base Thymin
T	Tesla (im Zusammenhang mit MRT)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Top-I	Topoisomerase-I
Top-II	Topoisomerase-II
UV	Ultraviolette Strahlung
VK	Variationskoeffizient
WHO	Weltgesundheitsorganisation
γ H2AX	An Serin 139 phosphoryliertes H2AX

1 Einleitung

Das größte Biomolekül einer Zelle ist die Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA), die den Aufbau der Proteine sowie die Zusammensetzung vielzähliger funktionaler Ribonukleinsäuren verschlüsselt. Ihre Integrität zu bewahren, ist essentiell für die Aufrechterhaltung intakter Zellfunktionen [1]. Gleichwohl ist die DNA eine chemische Struktur, die durch endo- und exogene Noxen permanenten Schädigungen ausgesetzt ist. Um potentiellen Mutationen entgegenzuwirken, werden DNA-Läsionen durch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen behoben. Mithilfe von unterschiedlichen Genotoxizitätstests lassen sich zum einen mutagene Substanzen identifizieren und zum anderen DNA-Reparaturprozesse analysieren [2].

Im Folgenden soll ein Überblick über den Aufbau der DNA, häufige Schädigungsformen, deren Reparaturmechanismen sowie über etablierte Methoden zur Genotoxizitätsbestimmung gegeben werden.

1.1 Arten und Ursachen von DNA-Schäden

1.1.1 Aufbau der DNA und Organisation im Chromatin

Neben einem geringen Prozentsatz an mitochondrialer DNA ($\sim 1\%$) [3] befindet sich, verteilt auf 46 Chromosomen, im Nukleus einer jeden kernhaltigen humanen Körperzelle eine identische Kopie der genomischen DNA [4,5]. Der genetische Code beruht dabei auf der spezifischen Sequenz der stickstoffhaltigen Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie der Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) [6].

Die einzelnen Basen werden über eine N-glykosidische Bindung an das C1'-Atom einer Pentose gebunden (Abb. 1.1). Aus der Verknüpfung der Basen mit der Pentose Desoxyribose resultieren die 4 DNA-Nukleoside Desoxyadenosin (dA), Desoxyguanosin (dG), Desoxycytidin (dC) und Desoxythymidin (dT). Im Gegensatz dazu werden die vier Basen A, G, C und Uracil (U statt T) der Ribonukleinsäure (RNA) an die Pentose Ribose gebunden. Nach der Veresterung des C5'-Atoms des Zuckers mit einem Phosphatrest entsteht aus dem Nukleosid ein Nukleotid [7].

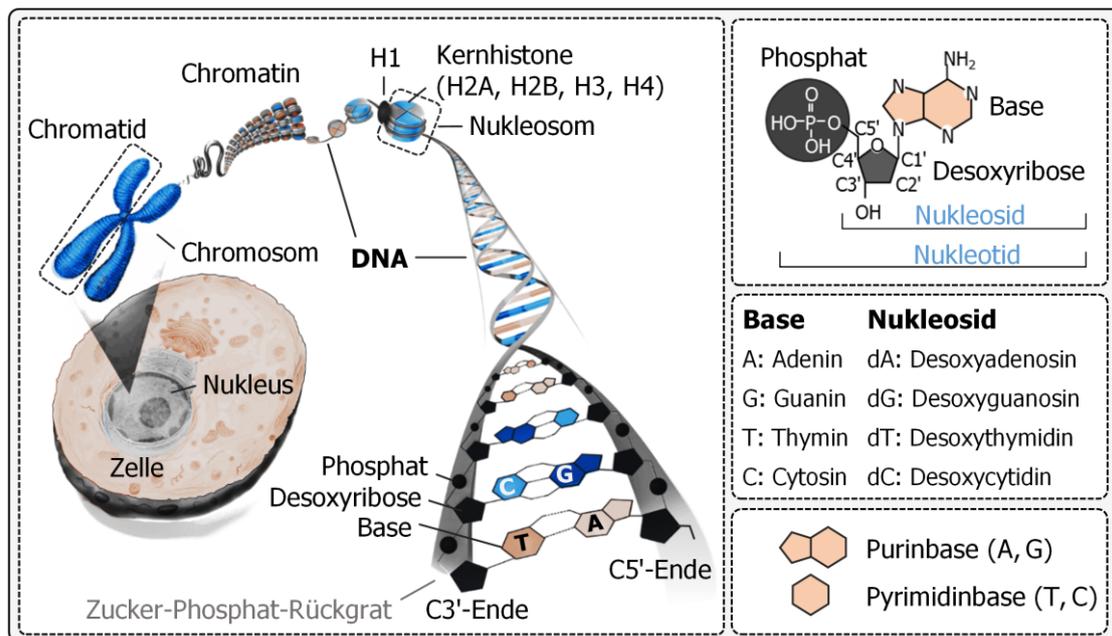


Abb. 1.1: Aufbau der DNA und Organisation im Chromatin

Schematische Darstellung der DNA-Zusammensetzung aus zwei antiparallel verlaufenden Nucleotidsträngen, welche nach Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin bzw. zwischen Guanin und Cytosin über Wasserstoffbrückenbindungen als Doppelhelix zusammengehalten werden. Die Anordnung der DNA mit Histonproteinen in Nucleosomen sowie in weiteren Organisationsebenen des Chromatins ermöglichen die Kondensation der DNA im Nukleus. Details siehe Kapitel 1.1.1. Modifizierte Abbildung von: [293].

Ein Mononucleotid wird durch Phosphodiesterbindung mit dem C3'-Atom des benachbarten Nucleotids verbunden und folglich der DNA-Einzelstrang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Wie im Modell von Watson und Crick 1953 beschrieben, formen jeweils zwei dieser helicalen Polydesoxynucleotidstränge eine rechtsgängige DNA-Doppelhelix [7].

Hierbei werden die beiden Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen jeweils einer Purin- und einer Pyrimidinbase zusammengehalten. Diese Basenpaarung ist spezifisch und erfolgt unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin (A=T) sowie unter Bildung von drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin (G≡C) [6]. Die Stabilität der doppelsträngigen DNA wird durch weitere nicht-kovalente Bindungen zwischen den planar angeordneten Basen verstärkt, wie van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die nach außen gerichteten Zucker-Phosphatreste bilden das negativ geladene Rückgrat der Doppelhelix. Beide Stränge verlaufen antiparallel, d. h. in entgegengesetzter Orientierung vom 3'→5'-Ende bzw. 5'→3'-Ende. Die Lese- und Syntheserichtung verläuft jedoch für beide Stränge immer in 5'→3'-Richtung [7].

Die nukleäre DNA ist bei Eukaryoten nicht ringförmig auf Plasmiden, sondern linear auf Chromosomen verteilt. Um die rund 1,8 m DNA pro Zelle dicht zu packen, zu schützen und zu regulieren, ist die Erbinformation im Chromatin organisiert, welches zu ca. einem Drittel aus DNA und zwei Dritteln aus Proteinen besteht [7,8]. Die unterste Organisationsebene des Nukleofilaments bilden die Nukleosomen. Diese setzen sich aus den Kernhistonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 zusammen, die nach Heterodimerisierung ein scheibenförmiges Histonoktamer ((H2A-H2B)-(H3-H4)₂-(H2B-H2A)) ausbilden. Die positiven Ladungen der basischen Aminosäuren in den Histonmolekülen ermöglichen die Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, welche das Histonoktamer als flache Superhelix mit 1,8 Windungen umschließt. Zusammen formen Kernhistonkomplex und DNA ein Nukleosom [9,10]. Die internukleosomale DNA ist mit dem Verbindungshiston H1 assoziiert, welches von außen an den Nukleosomkern angelagert ist. Zusätzlich wickelt sich dieses perlenschnurartige Nukleosomenfilament zur weiteren Verdichtung spiralförmig zu 30-nm-Chromatinfasern auf und ordnet sich zu Schleifen und Chromatin-Superkomplexen im Chromosom an (Abb. 1.1). Durch die Verankerung mit einer Proteinmatrix aus Histon- und Nicht-Histonproteinen wird eine Stabilisierung der Chromatinstrukturen höherer Ordnung gewährleistet [7].

Während die Chromosomen in der Metaphase, direkt vor der Zellteilung, ihre maximale Kondensation aufweisen, füllen sie als locker gepacktes Chromatin in der Interphase den Großteil des Zellkerns aus. Die Struktur und Assoziation der DNA mit den Nukleosomen ist hoch dynamisch. Über posttranslationale Modifikationen der Histonenden, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinylierung, erfolgt eine Regulation der DNA-Kondensation. Durch Histonacetylierung wird z. B. die positive Ladung der Histone reduziert und darüber die DNA-Interaktion verringert. Die lokale Dekondensation erleichtert anschließend u. a. die Bindung von Replikations- oder Transkriptionsfaktoren [11]. Darüber hinaus beeinflusst die Chromatinstruktur ebenfalls die Anlagerung von Reparaturmolekülen und somit die Effizienz der DNA-Reparatur [12].

Folglich stellt der durch posttranslationale Histonmodifikationen generierte Histon-Code neben der DNA-Methylierung und RNA-Interferenz einen dritten wesentlichen epigenetischen Regulationsmechanismus dar. Die auf diese Weise spezifisch regulierte Genaktivierung wirkt sich auf das Expressionsmuster und die Differenzierung der verschiedenen Zellen eines Organismus aus [11]. Während genetisch inaktive Bereiche hoch kondensiert im Heterochromatin angeordnet sind, liegen aktive Gene während der Interphase entspiralisiert im Euchromatin vor [13].

1.1.2 Ursachen von DNA-Schäden

Die DNA einer jeden Zelle ist permanenten Schädigungen ausgesetzt, wodurch statistisch eine Anzahl von 10^5 DNA-Läsionen pro Zelle und Tag entstehen [14]. Diese sind zum einen auf endogene Ursachen zurückzuführen, wie spontane Reaktionen, Fehler bei der Replikation bzw. Schädigungen durch Stoffwechselprodukte, oder werden zum anderen durch exogene Einwirkungen hervorgerufen [15], siehe (Abb. 1.2 A).

Endogene Ursachen

Der überwiegende Anteil an DNA-Schäden wird von endogenen Substanzen verursacht, wie reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), die als Nebenprodukte bei der Zellatmung entstehen, z. B. H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ [1]. ROS verursachen eine Vielzahl stark mutagener Schäden, wie die Oxidation von dG zu 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OH-dG) oder 8-oxo-dG und eine daraus resultierende G-A-Fehlpaarung [12]. Zudem stellen spontane Depurinierungen oder Desaminierungen häufige Ursachen für DNA-Läsionen dar. Depurinierungen induzieren täglich bei ca. 10^4 Purinbasen (A, G) einer Zelle die thermische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Gerüst. Dieser Basenverlust führt zur Ausbildung einer sogenannten apurischen bzw. apyrimidinischen (AP)-Stelle und kann einen Einzelstrangbruch auslösen. Durch eine spontane Desaminierung von Cytosin entsteht Uracil, welches Adenin anstelle des ursprünglich lokalisierten Guanins bindet [1].

Bei der Replikation ruft vor allem die Tautomerie der Basen Fehlpaarungen hervor. Die Basen Thymin und Guanin befinden sich im Gleichgewicht zwischen ihrer stabilen Keto-Form und dem selteneren Enol-Isomer und die Basen Adenin und Cytosin zwischen Amin (häufig) und Imin (selten). Liegen die Basen bei der Replikation in der seltenen Enol- bzw. Iminform vor, führt dies zur Umkehr der Basen und zur Fehlpaarung von T-G bzw. A-C [16].

Neben ungewollten DNA-Schäden existieren gezielt induzierte intermediäre Strangbrüche. Hierzu zählen u. a. Einzel- und Doppelstrangbrüche, die kurzzeitig zur Entspiralisierung der DNA durch Topoisomerasen hervorgerufen werden [7]. Darüber hinaus werden temporäre DNA-Doppelstrangbrüche während verschiedener Rekombinationsprozesse verursacht, z. B. im Rahmen der Meiose bei der Keimzellbildung oder der somatischen Rekombination bei der Konfiguration von Immunrezeptoren [17,18].

Exogene Ursachen

Neben endogenen Faktoren kann die DNA durch eine Vielzahl exogener physikalischer, chemischer oder biologischer Agenzien geschädigt werden. Die Bestrahlung mit ultravioletttem Licht verursacht die Bildung von Pyrimidindimeren (z. B. 6-4-Photoproducte (6-4PPs) oder Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPD)), die während der Synthesephase zu einer Blockade der Replikationsgabel führen. Energetischere ionisierende Strahlung, wie

Röntgenstrahlung oder radioaktive Gammastrahlen, können direkt Einzel- und Doppelstrangbrüche induzieren und lösen Basenmodifikationen sowie eine erhöhte Ionisierung und Radikalbildung aus [19,20].

DNA-Schäden können darüber hinaus durch chemische Agenzien in Umweltgiften, Nahrungsmitteln oder Arzneistoffen hervorgerufen werden. Beispiele dafür sind polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe im Zigarettenrauch, Nitrosamine, Schimmelpilze oder Chemotherapeutika. Ein Großteil mutagener Substanzen erlangt seine genotoxische Wirkung jedoch erst nach körpereigener Biotransformation durch Phase-I/II-Enzyme des Stoffwechsels [12]. Kanzerogene Substanzen führen z. B. als alkylierende Agenzien zu Basenmodifikationen und Bildung kleiner und großer (engl. bulky) DNA-Addukte oder Quervernetzungen. Andere Stoffe wirken als Basenanaloga oder als interkalierende Substanzen und induzieren darüber Fehlpaarungen bzw. Vernetzungen der DNA-Stränge [16]. Diese Eigenschaften werden z. B. bei Zytostatika in der Krebstherapie genutzt.

Auf biologische Weise kann die DNA durch Einbau viraler DNA-Fragmente, z. B. von humanen Papillomaviren, geschädigt werden. Die Integration eines ganzen Fragments im Bereich eines Gens kann dieses deaktivieren bzw. die Synthese eines funktionalen Proteins beeinträchtigen, wodurch wiederum schwerwiegende Schäden im Organismus hervorgerufen werden können [19].

1.1.3 DNA-Reparaturmechanismen in eukaryotischen Zellen

Obgleich Mutationen und die daraus resultierenden phänotypischen Veränderungen die Basis der Evolution darstellen, gilt es, unkontrollierte Veränderungen zu minimieren [21,22]. Im Gegensatz zu Proteinen und Lipiden, die einem Recyclingprozess aus Synthese und Degradation unterliegen, wird die DNA nicht fortwährend ausgetauscht. Sie besteht im Verlauf des gesamten Lebenszyklus einer Zelle und wird an ihre Tochterzellen bzw. bei Keimzellen an die kommende Generation weitergegeben [1,2]. Um ein Gleichgewicht zwischen Variabilität und Stabilität des Genoms herzustellen, entwickelte sich im Laufe der Evolution ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen DNA-Reparatursystemen [22]. Die einzelnen Mechanismen sind auf die Erkennung und Wiederherstellung spezifischer DNA-Läsionen ausgerichtet. Dieser Prozess kann verallgemeinert in folgende Schritte unterteilt werden: 1. Schadenserkennung durch Sensor-Moleküle, 2. Beseitigung der DNA-Läsion bzw. Aufbereitung der DNA-Enden durch Endonukleasen (innerhalb des DNA-Stranges) bzw. Exonukleasen (am Strangende) sowie 3. Synthese neuer Nukleotide durch DNA-Polymerasen und anschließende Strangverknüpfung mithilfe von Ligasen [22]. Zwischen den unterschiedlichen Reparaturmechanismen zeigt sich jedoch eine deutliche Redundanz und Überschneidung [23]. Im Folgenden werden die relevantesten DNA-Reparaturmechanismen humaner Zellen kurz beschrieben (Abb. 1.2 B).

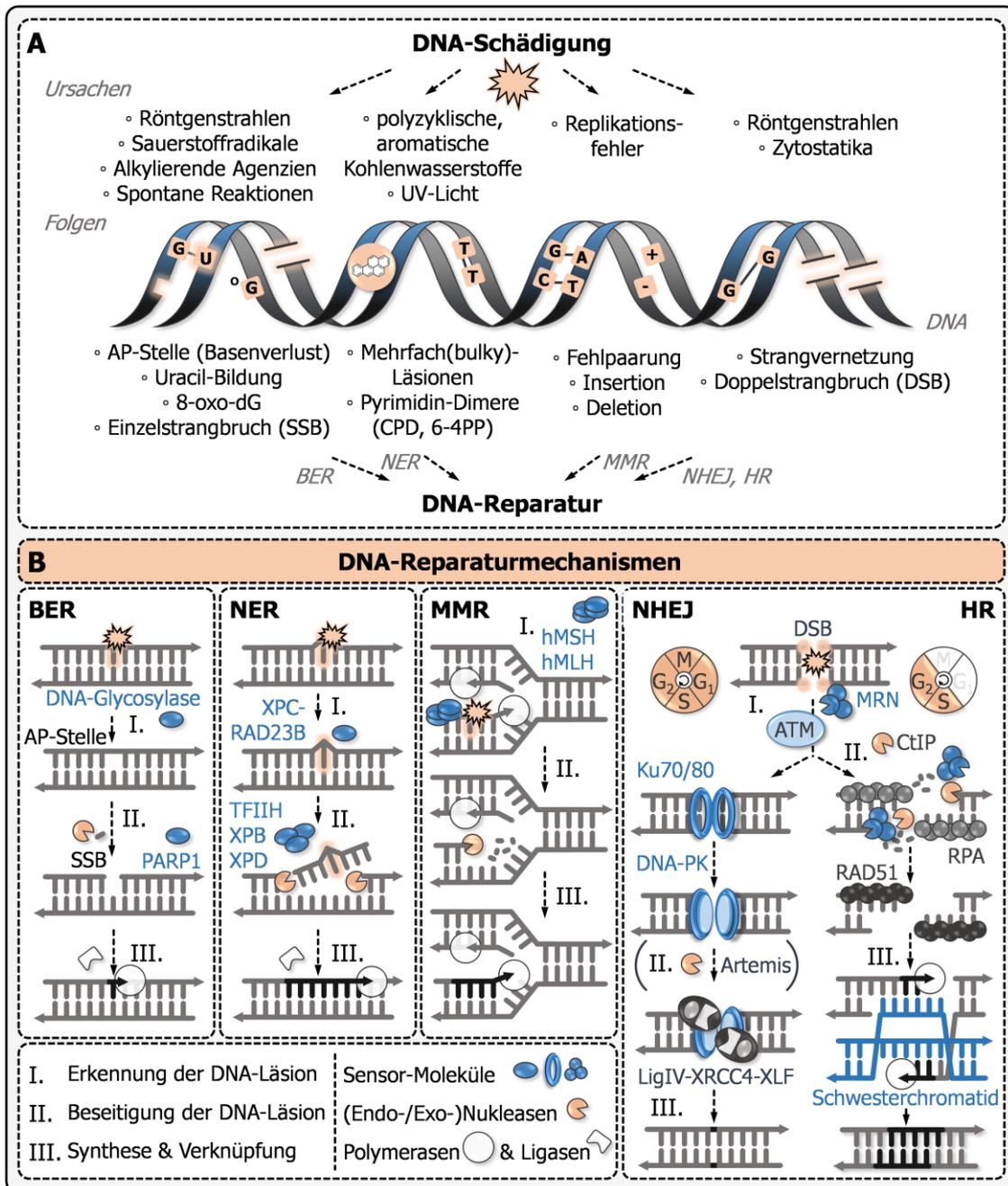


Abb. 1.2: Ursachen und Arten unterschiedlicher DNA-Läsionen sowie vereinfachte Modelle wesentlicher DNA-Reparaturmechanismen humaner Zellen

A) Schematische Übersicht wesentlicher endogener und exogener Noxen sowie die dadurch verursachten DNA-Schäden. **B)** Vereinfachte Darstellung fünf fundamentaler DNA-Reparaturmechanismen: Basenexcisionsreparatur (BER), Nukleotidexcisionsreparatur (NER), Mismatch- bzw. Fehlpaarungsreparatur (MMR), Nicht-homologe-Enden-Verknüpfung (NHEJ), Homologe Rekombination (HR). Abhängig von der DNA-Läsion werden spezifische DNA-Reparaturmechanismen aktiviert, deren Ablauf grob in die folgenden Prozesse unterteilt werden kann: **I.** Erkennung der DNA-Läsion durch Sensormoleküle, **II.** Entfernung der veränderten Nucleotide bzw. Prozessieren der Strangenden durch Endo- bzw. Exonukleasen und **III.** Auffüllen der Lücke mithilfe von DNA-Polymerasen und Verknüpfung der Nucleotide durch Ligasen (Details siehe Kapitel 1.1.2 – 3). Abbildungen erstellt in Anlehnung an: [20,22].

Basenexzisionsreparatur (BER)

Der Hauptmechanismus für die Beseitigung oxidativer DNA-Schäden, geringfügig veränderter Basen sowie für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen ist die *Basenexzisionsreparatur (BER)*. Als Sensor-Moleküle detektieren substratspezifische DNA-Glycosylasen die beeinträchtigte Base und entfernen diese aus dem Zuckerphosphatrückgrat. An der entstandenen AP-Stelle wird durch die AP-Endonuklease (APE1) die Phosphodiesterbindung aufgetrennt und ein Einzelstrangbruch generiert. Dieser wird anschließend durch DNA-Polymerase- β mit einem neuen Nukleotid gefüllt und dieses mithilfe von DNA-Ligasen (LIG1 bzw. LIG3) kovalent mit dem DNA-Strang verknüpft (Abb. 1.2 B). Direkt induzierte DNA-Einzelstrangbrüche werden darüber hinaus durch das Enzym Poly(ADP-ribose)Polymerase-1 (PARP1) detektiert. Neben der häufigen *Short patch BER*, bei der nur ein Nukleotid ausgetauscht wird, existiert eine *Long patch BER*, bei der ca. 2 – 10 Nukleotide entfernt werden [20,24].

Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Bei der *Nukleotidexzisionsreparatur (NER)* werden größere DNA-Schäden (engl. bulky lesions), wie DNA-Addukte mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, UV-induzierte Pyrimidindimere (T=T) oder kovalent-verknüpfte Nukleotide anhand der veränderten DNA-Konformität vom XPC-RAD23B-Komplex erkannt. An den Komplex assemblieren weitere Moleküle, wie TFIIH oder XPB und XPD, wodurch die DNA an dieser Stelle entwunden und geöffnet wird. Mithilfe von zwei Nukleasen erfolgt an beiden Enden die Entfernung des beschädigten DNA-Fragments. Anschließend wird die Lücke mit Nukleotiden geschlossen (Abb. 1.2 B). Es werden zwei NER-Formen unterschieden. Während bei der sogenannten *globalen NER* DNA-Läsionen im gesamten Genom mit gleicher Effizienz repariert werden, erfolgt die *transkriptionsgekoppelte NER* nur in transkriptionell aktiven DNA-Abschnitten [20,25].

Fehlpaarungs-Reparatur (Mismatch-Repair, MMR)

Mithilfe der *Mismatch-Reparatur (MMR)* werden Fehlpaarungen, Insertionen oder Deletionen unmittelbar nach der DNA-Replikation korrigiert (Abb. 1.2 B). Läsionsspezifisch erkennen unterschiedliche heterodimere hMSH-Komplexe (humanes MutS-Homolog) die Fehlpaarung (hMSH2/6) oder die Insertion bzw. Deletion (hMSH2/3) am fehlerhaften Abschnitt und rekrutieren heterodimere hMLH-Komplexe (humanes MutL-Homolog). Über Mechanismen, die im Falle von eukaryotischen Zellen nicht eindeutig bekannt sind, ermöglichen die hMLH-Dimere die Unterscheidung zwischen parentalem Matrizenstrang und neusynthetisiertem, fehlerhaften Tochterstrang. Letzterer wird im Bereich zwischen der Fehlpaarung und der Replikationsgabel durch Exonukleasen abgebaut und anschließend erneut synthetisiert [20,26].

Nicht-homologe-Enden-Verknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ)

Eine der schwerwiegendsten Formen von DNA-Läsionen stellen DNA-Doppelstrangbrüche dar. Sie werden insbesondere durch den MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) erkannt, woraufhin die Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-ähnliche-Kinase (PIKK) Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) zum DSB rekrutiert wird [27]. Um den Abbau der DNA durch Exonukleasen wie MRE11 des MRN-Komplexes zu verhindern, bindet beim Reparaturprozess der klassischen bzw. *kanonischen Nicht-homologe-Enden-Verknüpfung* (engl. *c-NHEJ*) ein Heterodimer aus Ku70/Ku80 an die freien DNA-Enden [28]. Die cNHEJ stellt den häufigsten und schnellsten Mechanismus zur Reparatur von DSB dar. Dabei werden die vier freien Strangenden der Doppelhelix ohne Vergleich eines homologen Stranges verbunden, weshalb es sich hierbei um einen sehr fehlerbehafteten Prozess handelt [29]. Nach Bindung des Ku70/Ku80-Komplexes wird die PIKK DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) rekrutiert, welche mit dem Ku-Dimer am DSB zur DNA-Proteinkinase (DNA-PK) assembliert [30]. DNA-PK-Komplexe an zwei benachbarten DSB-Enden formen eine Synapse, wodurch die gegenseitige Aktivierung und das Zusammenhalten der Enden hervorgerufen wird [28]. Im folgenden Schritt werden die kompatiblen DNA-Enden mithilfe des LigaseIV-XRCC4-XLF-Komplexes kovalent miteinander verbunden (Abb. 1.2 B).

Rund 85 – 90 % der strahlungsinduzierten DSB werden über diesen schnellen Reparaturmechanismus, ohne bzw. mit nur geringer Modifikation der Enden, verknüpft [29,31]. Bei Brüchen, die starke Schädigungen aufweisen (dirty ends), ist zuvor eine Aufbereitung der Strangenden (end processing), z. B. durch Hinzufügen fehlender bzw. Entfernung überstehender Nukleotide, notwendig. In diesen Prozess sind verschiedene Nukleasen (z. B. Artemis), Polymerasen (z. B. Pol μ , Pol λ) und weitere Faktoren involviert [28]. Neben der klassischen NHEJ-Reparatur existieren *alternative NHEJ-Mechanismen (alt-NHEJ)*, die weitestgehend unabhängig von den zuvor genannten Reparaturfaktoren verlaufen [32].

Reparatur durch Homologe Rekombination (HR)

Ein weiterer Mechanismus zur Reparatur von DNA-DSB ist der evolutionär hoch konservierte Prozess der *homologen Rekombination* (HR). Da die HR auf das replizierte Schwesterchromatid und den Austausch komplementärer Sequenzen zurückgreift, ist sie präziser als die NHEJ. Die HR kann jedoch daher nur nach der DNA-Verdopplung in der S- bzw. G₂-Phase des Zellzyklus erfolgen. Eine wichtige Funktion hat die HR insbesondere bei der Reparatur blockierter bzw. kollabierter Replikationsgabeln im Verlauf der DNA-Synthese. Anders als bei der NHEJ, kann das dabei entstandene einzelne Doppelstrangende nicht mit einem dazugehörigen zweiten Strang verknüpft werden [29].

Während bei der NHEJ die freien DSB-Enden geschützt werden, erfolgt bei der HR u. a. durch CtIP (C-terminal-binding protein(CtBP)-interacting protein) und den MRN-Komplex

die Resektion des 5'-Endes beider Bruchstellen, wodurch die Bildung freier 3'-Einzelstrangüberhänge hervorgerufen wird [32]. Zur Stabilisierung und zum Schutz vor Verdau erfolgt eine Ummantelung der Einzelstrangbereiche durch RPA (replication protein A), welches anschließend durch die Rekombinase RAD51 mithilfe von BRCA2 ausgetauscht wird. Das daraus gebildete Nukleoproteinfilament ermöglicht in Kombination mit weiteren Faktoren die Suche nach homologen Sequenzen im parallel angelagerten Schwesterchromatid [33]. Während dieser Stranginversion formt sich eine Schleife (engl. displacement (D)-loop)) zwischen dem Einzelstrangüberhang der geschädigten DNA und dem komplementären, unbeschädigten Doppelstrang. Der fehlende Abschnitt wird mittels DNA-Polymerasen neu synthetisiert (Abb. 1.2 B). Je nach Mechanismus kann auch der zweite Einzelstrangüberhang in den D-loop integriert werden, wodurch eine zweifache Holliday-Struktur (engl. double holliday junction, dHJ) gebildet wird [27]. Abhängig von der Spaltung und Verknüpfung der beiden Chromatiden sind verschiedene Modelle mit oder ohne Rekombination (Crossover) möglich [34].

Trotz der präzisen DSB-Reparatur durch HR ist auch während der S- und G₂-Phase der dominante Mechanismus die schnelle NHEJ, die durch Bindung von Ku70/Ku80 an die DSB-Enden die Initialisierung der aufwendigen HR-Reparatur inhibiert [29,32]. Darüber hinaus existieren auch bei der HR alternative Reparaturwege. DSB, die sich im Bereich von repetitiven Nukleotidsequenzen befinden, können zusätzlich durch die inakkurate *Einzelstrangverknüpfung* (single-strand-annealing, SSA) verbunden werden. Hierbei erfolgt bei einem der überhängenden Einzelstränge eine Deletion der Nukleotide bis zur folgenden Wiederholungssequenz und die anschließende Modifikation und Verknüpfung des zweiten Stranges [32].

1.1.4 Auswirkungen persistenter DNA-Schäden

Genotoxizität, Mutagenität und Karzinogenität

Aufgrund innerer und äußerer genotoxischer Einflüsse unterliegt die DNA ständigen Veränderungen. Genotoxizität gilt als Indikator für Mutagenität und Karzinogenität, jedoch bestehen begriffliche Unterschiede. Genotoxische Agenzien können auf unterschiedliche Weise zur Schädigung des genetischen Materials führen. Sie induzieren entweder direkt oder über sekundäre Reaktionen Modifikationen an der DNA, inhibieren DNA-interagierende Enzyme (z. B. Topoisomerasen) oder beeinflussen Proteine des mitotischen Spindelapparats [35,36]. Die hervorgerufenen DNA-Schäden können anschließend durch spezifische DNA-Reparaturmechanismen beseitigt werden. Ist dies nicht möglich, wird entweder die Apoptose bzw. zelluläre Seneszenz, d. h. ein permanenter Zellzyklusarrest, ausgelöst oder es erfolgt die Replikation der Zelle trotz vorhandener oder fehlerhaft reparierter DNA-Läsion. Diese verursachen permanente Veränderungen im Erbgut (Mutationen) [2]. Mutationen können phänotypisch neutral sein, sich vorteilhaft auf den Organismus auswirken oder negative Konsequenzen haben. Wenn durch Mutationen Tumorsuppressorgene geschädigt (*loss-of-function*) bzw. Onkogene aktiviert (*gain-of-function*) werden, kann eine Karzinogenese induziert werden [37]. Darüber hinaus existieren auch nicht-genotoxische Karzinogene, die z. B. durch epigenetische Modifikationen zu einer veränderten Genexpression führen oder durch Störungen der interzellulären Zellkommunikation das Proliferationsverhalten von Zellen beeinflussen [38,39].

Folgen insuffizienter DNA-Reparatur

Die DNA-Reparatur stellt nur einen Teil der DNA-Schadensantwort dar, welche infolge von DNA-Schädigung aktiviert wird. Weitere Signalwege beeinflussen den Zellzyklus, die Transkription, die Chromatinstruktur, den Energiemetabolismus oder z. B. das Überleben der Zelle [18]. Fehler in der DNA-Reparatur können die Transkription oder Replikation hemmen, durch Induktion von Apoptose bzw. zellulärer Seneszenz vorzeitige Alterserscheinungen hervorrufen und entstandene Mutationen Erkrankungen wie Krebs auslösen [2]. Eine effiziente Reparatur von DNA-Schäden ist somit nicht nur essentiell für das Überleben und die Funktion der jeweiligen Zelle, sondern kann sich systemisch auf den gesamten Organismus auswirken.

Im Laufe des Lebens kommt es zur Akkumulation irreparabler DNA-Schäden und zur Anhäufung seneszenten Zellen [40,41]. Diese teilungsunfähigen Zellen sind keineswegs inaktiv, sondern weisen einen sogenannten seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotypen (SASP) auf, indem sie durch Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen Einfluss auf das umliegende Gewebe ausüben. Dieser Effekt, welcher der Wundheilung und Regeneration dient, kann bei einer Anreicherung von DNA-Läsionen und einer dauerhaften

Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen zu chronischen Entzündungen und Gewebedegenerationen führen [42]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von DNA-Schäden somit wesentlich den Alterungsprozess und die Entstehung altersbedingter Krankheiten, wie Herz-Kreislauf- oder neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes sowie Krebs beeinflusst [40,42].

DNA-Reparaturproteine sind nicht nur für die Reparatur von unwillkürlichen DNA-Läsionen, sondern auch für verschiedene biologische Prozesse relevant. Die inter- und intrachromosomale DNA-Rekombination während der Meiose ist bedeutend für die Neuverteilung des Erbguts bei der Keimzellentwicklung, die somatische Rekombination (*V(D)J-Rekombination*) gewährt die Diversität der Immunrezeptoren, die Klassenwechsel-Rekombination (engl. class switch recombination, CSR) ermöglicht den Wechsel der Antikörper-Isotypen [43,44]. Darüber hinaus sind DNA-Reparaturproteine mit in die Telomer-Homöostase involviert [18].

Der Einfluss und die Bedeutung von DNA-Reparaturmechanismen werden insbesondere durch die verschiedenen klinischen Auffälligkeiten deutlich, die Patienten mit DNA-Reparaturdefekten aufweisen. Zu Chromosomeninstabilitätssyndromen zählen u. a. Erbkrankheiten wie Ataxia teleangiectasia (ATM-Gendefekt) oder das Nijmegen-Breakage-Syndrom (Nbs1-Gendefekt, Teil des MRN-Komplexes) [45]. DNA-DSB-Reparaturdefekte führen bei beiden Krankheitsbildern z. T. zu ähnlichen klinischen Symptomen. Die Patienten besitzen eine Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und weisen zudem Prädispositionen zur Tumorentwicklung auf. Die Gendefekte führen darüber hinaus zu Immundefizienzen und häufig zur Unfruchtbarkeit [45,46]. Beide DNA-Reparaturdefekte weisen ein breites Spektrum an phänotypischen Veränderungen auf, wodurch erneut die Komplexität und Relevanz der verschiedenen Reparaturmechanismen deutlich wird.

1.2 Analysemethoden zur Genotoxizitätsbestimmung

Zur Analyse potentiell schädlicher Substanzen wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Genotoxizitätstests entwickelt. Standardisierte Protokolle und Vorschriften international anerkannter Testmethoden zur (geno)toxischen Prüfung chemischer und pharmakologischer Agenzien sind u. a. in Richtlinien der *Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung* (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) oder der *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) aufgeführt [47,48]. Im Folgenden sollen einige der relevantesten Methoden, die vorwiegend in den internationalen OECD-Richtlinien zur Prüfung von Chemikalien (Abschnitt 4: Auswirkungen auf die Gesundheit) beschrieben sind [47], kurz erläutert werden.

1.2.1 Reportersysteme zur Detektion von Genmutationen

Prokaryotische Reportersysteme – Ames-Test

Eine der ältesten und verbreitetsten Methoden zur Mutagenitätsanalyse ist der bakterielle Rückmutations- bzw. Ames-Test (OECD #471). Hierbei werden als Indikatororganismen auxotrophe Mutanten verschiedener Stämme von *Salmonella typhimurium* genutzt, bei denen durch gezielte Mutation die Biosynthese der Aminosäure Histidin und folglich das Wachstum auf histidin-freiem Nährmedium inhibiert ist [49,50]. Erfolgt durch Testsubstanzen eine mutageninduzierte Rückmutation (*Reversion*) und dadurch das Wiedererlangen der Histidinproduktion, führt diese zum Bakterienwachstum. Im konventionellen Ames-Test kann die Proliferation anhand zunehmender Zellkolonien auf dem Agar bzw. im Ames-Fluktuationstest anhand eines Farbumschlags des pH-Indikators in Mikrotiterplatten gemessen werden.

Eine Vielzahl an Substanzen erwirbt ihre mutagene Wirkung jedoch erst nach metabolischer Aktivierung durch Phase-I/II-Enzyme. Durch Zusatz einer subzellulären Fraktion der Rattenleber (S9-Mix, Mikrosom) wird versucht, diese Biotransformation unter In-vitro-Bedingungen zu imitieren [51]. Alternativ zu *Salmonella typhimurium* werden verschiedene auxotrophe Mutanten von *E. coli* genutzt [52]. Dennoch können Agenzien, die keine Genmutationen (z. B. Punktmutation), sondern ausschließlich Genommutationen (Veränderungen des Chromosomensatzes) oder Chromosomenmutationen (strukturelle Veränderungen, z. B. Deletion) induzieren, mithilfe des Ames-Test nicht detektiert werden [53].

Eukaryotische Reportersysteme – Mauslymphom-Assay

Neben Systemen basierend auf Hefe- oder Vogelzellen werden vor allem Säugetierzelllinien als Reportersysteme verwendet. Dabei ist der Mauslymphom-Assay (MLA, OECD #476) einer der am häufigsten genutzten eukaryotischen In-vitro-Genmutationstest [54,55]. Hierbei wird die Vorwärtsmutation und der damit verbundene Verlust der aktiven Thymidin-Kinase (Tk) in der Mauslymphom-Zelllinie L5178Y $Tk^{-/+}$ beobachtet. Zum beschleunigten Mutationsnachweis besitzt diese Zelllinie bereits nur noch ein funktionsfähiges Allel für Tk. Nach Behandlung mit der Testsubstanz wird die Integrität des Tk-Genes als Selektionsmerkmal genutzt. Während Tk-aktive $Tk^{-/+}$ -Zellen nach Inkubation mit dem letalen Thymidinanalogon Trifluorothymidin dieses verstoffwechseln und sterben, wird bei mutierten $Tk^{-/-}$ -Zellen Thymidin *de novo* synthetisiert und diese Resistenz an Tochterzellen weitergeben [56]. Anhand der entstandenen Anzahl an Kolonien und deren Größe können Rückschlüsse über die Mutagenität der Testsubstanz gezogen werden. Die Ausbildung detektierbarer Kolonien kann jedoch rund zwei Wochen benötigen [53].

1.2.2 Zytogenetischer Nachweis von Chromosomenschäden

Chromosomenaberrationstest

Beim Chromosomenaberrationstest (CA, OECD #473) werden Chromosomen von Metaphasezellen, meist humane Lymphozyten oder Hamsterzelllinien, lichtmikroskopisch auf numerische und strukturelle Veränderungen untersucht [53,57]. Dieser Test ist bereits seit mehr als 40 Jahren etabliert und stellt bis heute den Goldstandard für die Genotoxizitätsbestimmungen, besonders in der Bestrahlungsdosimetrie, dar [58]. In der Routinediagnostik findet vor allem die Quantifizierung fusionierter, dizentrischer Chromosomen Anwendung (kurz DIC), siehe Abb. 1.3 A. Es können zudem Genommutationen und weitere Chromosomenmutationen, wie Strangbrüche, Deletionen oder Translokationen erfasst werden [58]. Um die Sensitivität zu erhöhen und Veränderungen nachzuweisen, die mittels klassischer Giemsa-Bandenfärbung schwer bzw. nicht detektiertbar sind, kann die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) genutzt werden. Hierbei werden Chromosomen oder Chromosomenabschnitte spezifisch mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden gekennzeichnet [51,59].

Mikronukleustest

Eine etablierte Methode zur In-vitro-Untersuchung von Chromosomenbrüchen, Störungen des Mitoseapparates und des Proliferationsverhaltens ist der Mikrokern- bzw. Mikronukleustest (OECD #487) [60,61]. Für diesen Test werden vorwiegend MNZ in Vollblutkulturen oder isolierte Lymphozyten genutzt, welche nach oder während der Exposition durch Mitogene für 72 h stimuliert werden [60]. Um die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung, während der Mitose zu verhindern, wird 44 h nach Stimulationsbeginn der Zytokineshemmer Cytochalasin B zur Kultur gegeben. Nach einer Mitose entstehen binukleäre Zellen [53]. Azentrische Chromosomenfragmente, die aufgrund ihres fehlenden Zentromers während der Mitose nicht mit dem Spindelapparat assoziieren können, bleiben an der Äquatorialebene zurück und formen separate Mikronuklei (MN) (Abb. 1.3 B). Neben klastogenen Substanzen, die Chromosomenbrüche und zentromer-negative MN hervorrufen, können mithilfe dieses Test Aneugene (Spindelgifte) identifiziert werden. Diese führen zum Verlust ganzer Chromosomen und zur Ausbildung zentromer-haltiger Mikronuklei. Eine Zentromerfärbung der Mikronuklei ermöglicht die Unterscheidung beider Substanzklassen [62]. Durch FISH können Zentromere sowie andere Chromosomenbereiche markiert und Informationen über das Erbgut im Mikronukleus gewonnen werden.

Für die Auswertung dieses Tests werden mikroskopisch ca. 1.000 – 2.000 binukleäre Zellen auf Mikronuklei untersucht [53,60]. Darüber hinaus lassen sich aus der Anzahl der Hauptkerne, d. h. aus dem Verhältnis zwischen mono-, bi- und multinukleären Zellen, Rückschlüsse auf die Zahl der Mitosen und das Proliferationsverhalten ziehen [60]. Neben

den Mikronuklei können weitere Strukturen, wie Verbindungen der beiden Hauptkerne (engl. nucleoplasmic bridges, NPBs) als Folge dizentrischer Chromosomen, hervorgerufen werden [60,62].

Ein anerkannter In-vivo-Test ist die Untersuchung von Mikronuklei in Erythrozyten von Nagetieren (OECD #474). Bilden sich während der In-vivo-Behandlung in den Erythroblasten Mikronuklei, bleiben diese bei der Reifung zu Erythrozyten im Gegensatz zum Hauptkern erhalten und können anschließend in Blut- und Knochenmarkproben mikroskopisch oder durchflusszytometrisch nachgewiesen werden [63,64].

1.2.3 Molekularbiologische Analyse von DNA-Schäden

Im Gegensatz zu den zytogenetischen Genotoxizitätstests, deren Analyse zu einem Zeitpunkt nach Einsetzen der DNA-Reparatur erfolgt und welche daher Auskunft über entstandene Mutationen geben, handelt es sich bei den folgenden Nachweisverfahren nicht um Mutagenitätstests, sondern um Indikatortests. Mithilfe derer können insbesondere Informationen über die primäre DNA-Schädigung bzw. über spezifische zelluläre Reaktionen auf DNA-Schädigungen gewonnen werden, welche jedoch nicht unmittelbar Mutationen hervorrufen müssen [53].

Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)

Bei der Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) können DNA-Stränge und -Fragmente einer Probe durch Gelelektrophorese mit wechselnder Polung entlang ihrer Größe aufgetrennt werden [65]. Der sogenannte Comet-Assay (OECD #489) ermöglicht darüber hinaus mittels Einzelzell-Gelelektrophorese die Detektion von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen in individuellen Zellen [66,67].

Hierzu werden Zellen aus Kultur (In-vitro-Analyse) oder aus Blut- bzw. Gewebeproben (In-vivo-Analyse) als Einzelzellsuspension in einer Agarosegelschicht auf einem Objektträger immobilisiert, die Zellmembran und Proteine durch Lyse entfernt und die freie DNA-Doppelhelix durch Behandlung mit einer alkalischen Lösung entwunden und denaturiert [53]. Während der anschließenden Elektrophorese bleiben unbeschädigte Chromosomen im Kernbereich zurück, wohingegen separierte DNA-Fragmente im Gel entsprechend ihrer Größe Richtung Anode migrieren (Abb. 1.3 C). Zur Visualisierung erfolgt eine Silber- bzw. Fluoreszenzfärbung der DNA. Unter dem Mikroskop weisen unbeschädigte Zellen intakte Kerne auf und Zellen mit DNA-Fragment zeigen einen kometenartigen Schweif [53,67].

Brüche in den durch die alkalische Behandlung generierten DNA-Einzelsträngen resultieren zum einen aus zuvor direkt induzierten Einzel- und Doppelstrangbrüchen, können zum anderen aber auch durch „alkali-labile Stellen“ (z. B. AP-Stellen) oder während der Reparatur

anderer Schädigungen als Intermediate von Endonukleasen erzeugt worden sein [68]. Der Comet-Assay ermöglicht somit die Detektion eines breiten Spektrums an Schädigungsformen.

Pro Probe werden ca. 100 – 200 Zellen entsprechend ihrer Schweifgröße und -intensität manuell klassifiziert bzw. mittels Bildanalysesoftware quantifiziert. Neben dem alkalischen Comet-Assay existiert ein neutraler Comet-Assay sowie zahlreiche Erweiterungen und Modifikationen. Durch DNA-Verdau mit läsionsspezifischen Endonukleasen kann z. B. das Spektrum an DNA-Schäden erweitert oder durch Kombination mit FISH Informationen über die DNA-Schädigung oder DNA-Reparatur in spezifischen Genen gewonnen werden [68].

Immunassays zum indirekten Nachweis von DNA-Schäden

Durch technische Fortschritte in der Molekularbiologie und zunehmende Erkenntnisse über DNA-Reparaturmechanismen wurden neue Methoden zur Genotoxizitätsbestimmung entwickelt. Mithilfe spezifischer Antikörper kann die Konzentration eines Proteins bzw. einer Proteinmodifikation innerhalb einer Probe z. B. über das Western-Blot-Verfahren oder mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmt werden. Mithilfe der Durchflusszytometrie lässt sich nach Immunfluoreszenzfärbung darüber hinaus die Proteinexpression in individuellen Zellen analysieren. Die Erfassung von individuellen Zellen sowie deren intrazelluläre Proteinverteilung ermöglicht die Auswertung von Immunfluoreszenztests am Fluoreszenzmikroskop (Abb. 1.3 D).

Neben der Analyse von spezifischen Reparaturproteinen können auch modifizierte DNA-Strukturen nachgewiesen werden, wie oxidative DNA-Schäden (8-oxo-dG bzw. 8-OH-dG) [69,70]. Immunfluoreszenztests finden hierbei vor allem bei der Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen Anwendung. Verschiedene Proteine, die in die Reparatur involviert sind, reichern sich lokal am DSB an. Nach spezifischer Immunfluoreszenzfärbung kann der Doppelstrangbruch indirekt als sogenannter Focus mikroskopisch visualisiert werden. Die verbreitetste Antikörperfärbung zum Nachweis von DNA-DSB ist die Färbung des an Serin-139 phosphorylierten Histonproteins H2AX (γ H2AX) [71,72].

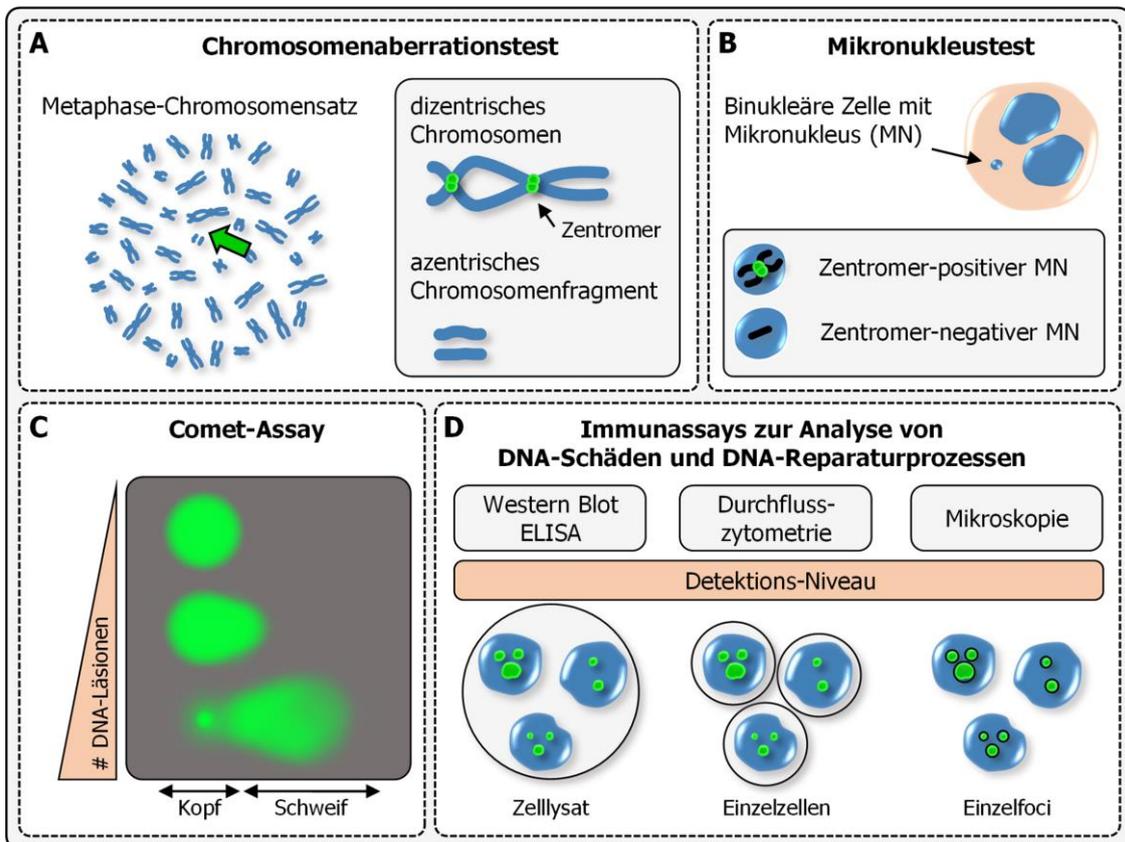


Abb. 1.3: Schematische Darstellung verbreiteter zytogenetischer und molekularbiologischer Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden

A) Der Chromosomenaberrationstest ermöglicht den Nachweis numerischer oder struktureller Chromosomenveränderungen. **B)** Die Separation von Chromosomenfragmenten bzw. von ganzen Chromosomen kann in Form von zentromer-negativen bzw. -positiven Mikrokernen im Mikronukleustest nachgewiesen werden. **C)** Der Comet-Assay ermöglicht durch Einzelzellgelelektrophorese den Nachweis von DNA-Strangbrüchen, deren Häufigkeit mit der Länge und Intensität des erzeugten DNA-Schweifs korreliert. **D)** Mithilfe spezifischer Antikörperfärbung können z. B. DNA-Modifikationen oder verschiedene DNA-Reparaturproteine nachgewiesen werden. Nach Induktion von DNA-DSB bilden verschiedene Proteine an der Bruchstelle einen Focus aus. Während bei Nachweisverfahren wie Western-Blot oder ELISA die Gesamtkonzentration der Moleküle im Zellysat ermittelt wird, erlaubt die Durchflusszytometrie die Intensitätsanalyse der einzelnen Zellen. Die individuellen Reparaturfoci innerhalb der einzelnen Nuklei können mithilfe mikroskopischer Analysen detektiert werden. Details siehe Kapitel 1.2.

1.3 Bedeutung und Nachweis von γ H2AX

1.3.1 Das H2AX-Histon und seine Bedeutung für die DSB-Reparatur

Eines der ersten Signale nach Induktion eines DNA-Doppelstrangbruches ist die Phosphorylierung des Histonmoleküls H2AX am Serin-139 [73]. Dieses stellt neben H2A.Z, H2A1 oder H2A2 eine Unterform der H2A-Histonfamilie dar. Zusammen mit Varianten der drei weiteren Kernhistonfamilien H2B, H3 und H4 formen H2A-Moleküle das Nukleosomen-Oktamer, mit je zwei Molekülen pro Histonfamilie [9,10]. Wie jedoch die verschiedenen Zusammensetzungen reguliert werden, wie die einzelnen Histonvarianten im Chromatin lokalisiert sind und welche Funktion unterschiedliche Kombinationen an Nukleosomen haben, ist aktuell nicht genau bekannt [74]. Untersuchungen in humanen Zellen bzw. Zelllinien ergaben, dass je nach Zelltyp 2 – 25 % des gesamten H2A-Gehalts von H2AX dargestellt werden [73]. Darüber hinaus bestärken Beobachtungen mittels hochauflösender Mikroskopie ein Modell, bei dem H2AX nicht zufällig über den Zellkern verteilt, sondern in bestimmten Chromatinregionen angereichert vorliegt [75].

Das H2AX-Histon ist evolutionär hoch konserviert und enthält am freiliegenden C-terminalen Ende ein charakteristisches SQ-Motiv (Abb. 1.4 A), welches H2AX von anderen H2A-Varianten unterscheidet [76,77]. Eine spezifische Phosphorylierung der Aminosäure Serin an Position 139 innerhalb dieses SQ-Motivs wurde im Jahr 1998 erstmals von Rogakou et al. als Reaktion auf Gammabestrahlung beschrieben [73].

In den darauffolgenden Jahren wurde dieser Biomarker genutzt, um DNA-Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen und weitere Prozesse im Rahmen der DNA-Schadensantwort (engl. DNA damage response, DDR) zu analysieren. Anhand Daten dieser Studien wurde ein Modell zur Schadenserkenkung von DNA-Doppelstrangbrüchen etabliert, wonach diese im ersten Schritt von spezifischen Sensormolekülen wie dem MRN-Komplex oder Ku70/80 detektiert werden (Abb. 1.4 B). Daraufhin werden die Kinasen ATM, DNA-PKcs oder ATR (ATR vor allem bei Strangbrüchen während der DNA-Replikation) an die Bruchstelle rekrutiert (siehe Kapitel 1.1.3 – NHEJ, HR). Nach ihrer Aktivierung initiieren diese Kinasen die spezifische Phosphorylierung des Serin-139 in benachbarten H2AX-Histonen. Mediatoren, wie das Gerüstprotein (engl. scaffolding protein) MDC1 (mediator of DNA damage check point 1) interagieren anschließend mit γ H2AX. Dies führt zu einer Rekrutierung weiterer MRN-Komplexe und ATM-Kinasen, die infolgedessen die umliegenden H2AX-Histone phosphorylieren [78]. Aufgrund dieser positiven Rückkopplung erfolgt im Zeitraum von ca. 30 – 60 min die Phosphorylierung mehrerer tausend H2AX-Moleküle im Umkreis von 2 – 40 Megabasenpaaren um den DNA-Doppelstrangbruch [78]. Die Signalamplifikation führt zur Ausbildung einer Reparaturzone, die nach spezifischer

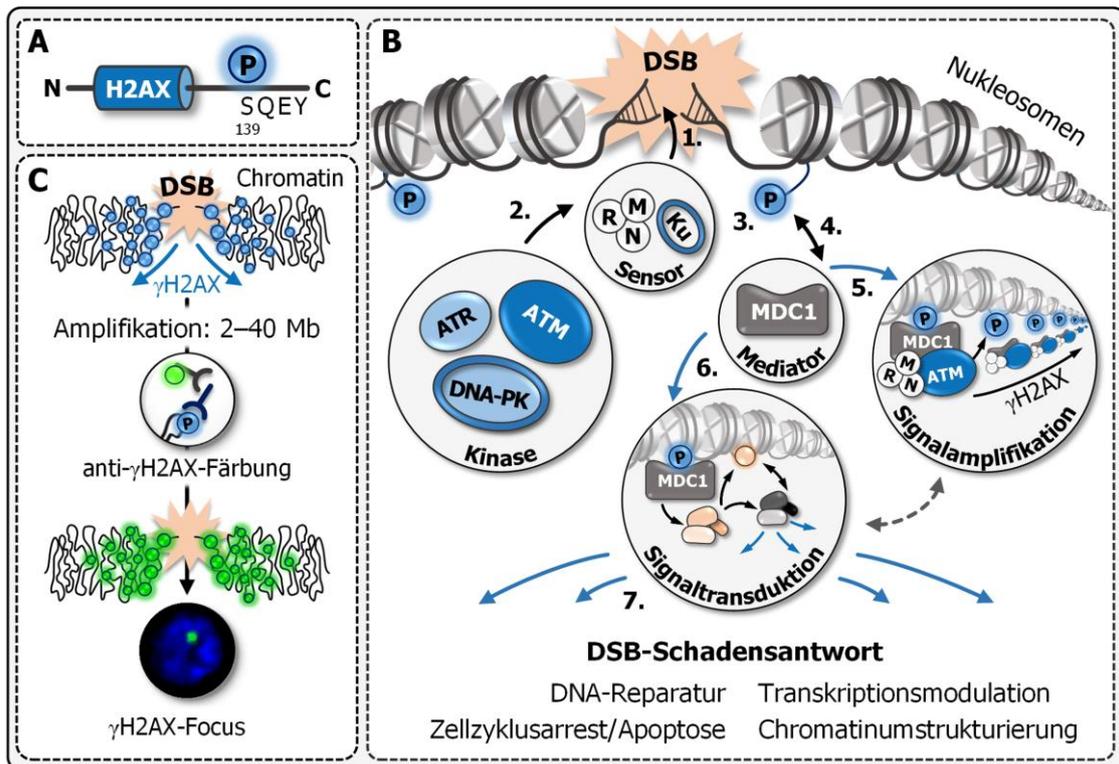


Abb. 1.4: Zelluläre DSB-Schadensantwort und Nachweis von γ H2AX-Foci

A) Im Vergleich zu anderen H2A-Histonvarianten besitzen H2AX-Moleküle ein SQ-Motif am C-terminalen Ende. In Folge eines DNA-DSB wird durch Phosphorylieren der darin integrierten Aminosäure Serin (Position 139) γ H2AX gebildet. **B)** 1. Nach Induktion des DNA-DSB erfolgt die Detektion der Läsion durch Sensormoleküle, wie dem MRN- oder Ku70/80-Komplex. 2. In Folge werden Kinasen wie ATM, DNA-PK oder ATR an den Strangbruch rekrutiert, welche 3. H2AX zu γ H2AX phosphorylieren. 4. Dies führt zur Interaktion zwischen γ H2AX und dem Mediator MDC1. 5. Durch MDC1 wird zum einen eine Amplifikation der γ H2AX-Phosphorylierung initiiert, indem weitere MRN-Komplexe sowie ATM-Kinasen zum DSB rekrutiert werden. 6. Zum anderen erfolgt eine verstärkte Akkumulation von Transducer- bzw. Effektorproteinen am DSB, welche das Signal kaskadenartig weiterleiten bzw. die DSB-Schadensantwort induzieren. 7. In Folge des DNA-DSB werden u. a. die DNA-Reparatur initiiert sowie die Transkription, der Zellzyklus und die Chromatinstruktur beeinflusst. **C)** Nach DNA-DSB-Bildung erfolgt die Ausbreitung der H2AX-Phosphorylierung im Bereich von 2–40 Megabasenpaaren um den DSB. Dieser γ H2AX-Focus kann durch spezifische Immunfluoreszenzfärbung im Zellkern angefärbt und mikroskopisch visualisiert werden. Details siehe Kapitel 1.3. Abbildungen erstellt in Anlehnung an: [72,76,78].

γ H2AX-Färbung als einzelner Punkt (γ H2AX-Focus) mikroskopisch visualisiert werden kann. Zum anderen bewirkt MDC1 die Translokation weiterer Proteine zum Doppelstrangbruch, die als Transducer an der Signalübertragung bzw. als Effektorproteine an der letztendlich induzierten Zellantwort beteiligt sind. Zu den Transducern zählen u. a. die Ubiquitinligasen RNF8 und RNF168, welche nach Modifikation von Chromatinkomponenten wie H2A oder H2B in einer zweiten Welle die Ansammlung zusätzlicher Reparaturfaktoren wie BRCA1 oder 53BP1 am Doppelstrangbruch veranlassen [27,72,79].

Im Rahmen der Schadensantwort wird eine komplexe Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung von Effektorproteinen führt. Diese werden u. a. für die Reparatur der DNA-Läsion benötigt, wirken sich auf die Transkription aus, führen zu Umlagerungen des Chromatins oder beeinflussen die Zellproliferation durch transienten Zellzyklusarrest bzw. durch Induktion von zellulärer Seneszenz oder Apoptose [18,80].

Zur Wiederherstellung der ursprünglichen Chromatinstruktur und Termination des Signalprozesses erfolgt nach Reparatur des DSB die Dephosphorylierung von γ H2AX. Anstelle eines Histon austauschs von γ H2AX mit H2AX-Molekülen geschieht dies bei höheren Eukaryoten wahrscheinlich durch direkte Dephosphorylierung im Nukleosom mithilfe der Phosphatasen PP2A, PP4, PP6 oder Wip1 [76,81,82].

Entgegen der ursprünglichen Hypothese, dass die Vielzahl an phosphorylierten H2AX Molekülen vor allem als Plattform für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren dient, weisen DSB-unabhängige γ H2AX Foci in Untersuchungen zunehmend auf die Bedeutung von γ H2AX insbesondere im Rahmen von Umlagerungsprozessen des Chromatins hin [79,83,84]. Wie der Übersichtsartikel von Turinetto et al. zusammenfassend schildert, konnten Studien einen Zusammenhang zwischen der H2AX-Phosphorylierung und der Inaktivierung von Gonosomen bei der Keimzell- oder Barkörperbildung sowie mit weiteren Aspekten der Zellteilung, Stammzellentwicklung und zellulären Seneszenz beobachten [83]. Darüber hinaus weisen u. a. apoptotische Zellen eine sogenannte pan-nukleäre γ H2AX-Färbung auf, bei welcher der gesamte Nukleus gefärbt ist [76,85].

1.3.2 Verfahren zum Nachweis von γ H2AX

Ursprünglich wurde γ H2AX von Rogakou et al. mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese identifiziert, bei der die extrahierten Histonmoleküle sowohl anhand ihrer Größe als auch anhand ihres isoelektrischen Punktes getrennt wurden [73]. Nach spezifischer Immunfluoreszenzfärbung und fluoreszenzmikroskopischer Analyse beschrieben die Autoren im Folgejahr die Expression von γ H2AX als einzelne nukleäre Punkte, deren Anzahl mit der Zahl der induzierten Doppelstrangbrüche korrelierte [71]. Nach der kommerziellen Verfügbarkeit spezifischer γ H2AX-Antikörper haben sich die sensitiveren immunologischen Nachweismethoden zur Quantifizierung des γ H2AX-Niveaus durchgesetzt [76,86].

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mittels ELISA können γ H2AX-Moleküle zum einen über das klassische Sandwich-Verfahren detektiert werden [87]. Hierfür werden Antikörper, die gegen das gesamte H2AX-Histon gerichtet sind, am Boden einer Mikrotiterplatte immobilisiert und darauf anschließend das

Zellysate der Probe inkubiert. Johnston et al. entwickelten hingegen einen ELISA, bei welchem die Wells direkt mit dem Zellysate inkubiert wurden [88]. Zum Nachweis der an Serin-139 phosphorylierten H2AX-Histone erfolgt die Inkubation der Proben mit einem phosphospezifischen γ H2AX-Antikörper. Dieser ist entweder direkt mit einem Markerprotein verknüpft oder wird in zusätzlichen Schritten mittels Sekundärantikörper kolorimetrisch, fluorometrisch oder luminometrisch nachgewiesen.

Eine weitere Variante ist der zell-basierte ELISA. Hierbei werden die Mikrotiterplatten direkt mit den Zellen inkubiert. Nach der Behandlung erfolgen die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sowie die Immundetektion der γ H2AX-Moleküle [89,90].

Western-Blot

Eine andere Methode zur Quantifizierung des γ H2AX-Gehalts ist die Durchführung eines Western-Blots [91]. In der Vorbereitung werden die Zellysate erhitzt und die Struktur der Proteine zusätzlich aufgebrochen, indem hydrophobe Wechselwirkungen durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) aufgelöst sowie Disulfidbrücken durch Zugabe von niedermolekularen Thiolen wie Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol reduziert werden [87,92]. Im ersten Schritt werden die denaturierten Proteine während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt und im zweiten Schritt auf eine Membran (Blot) transferiert [92]. Im dritten Schritt erfolgt die spezifische Proteindetektion mithilfe von γ H2AX-Antikörpern. Die γ H2AX-Moleküle besitzen ein Molekulargewicht von ca. 17 Kilodalton (kDa) und das Signal der Proben kann anschließend als Bande, je nach Sekundärantikörper, z. B. luminometrisch, fluorometrisch oder kolorimetrisch visualisiert werden [93].

Immunfluoreszenzanalyse mittels Durchflusszytometrie

Im Gegensatz zum ELISA oder Western-Blot-Verfahren ermöglicht die durchflusszytometrische γ H2AX-Quantifizierung eine Einzelzellanalyse. Hierbei werden die Zellen der Probe zuerst in Lösung fixiert und die Phospholipidmembranen permeabilisiert. Anschließend erfolgt die Immunfärbung mit γ H2AX-Antikörpern, die entweder direkt mit einem Fluorophor gekoppelt sind oder über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper nachgewiesen werden [91]. Bei der Fluoreszenzdetektion am Durchflusszytometer passieren die Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln den Laser. Dabei werden die Photonen, die der Anregungswellenlänge des Fluorophores entsprechen, absorbiert und Elektronen kurzzeitig auf ein energetisch höheres Niveau angehoben. Beim Abfall auf das ursprüngliche Energieniveau wird die freiwerdende Energie in Form von Wärme und Photonen abgegeben. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird detektiert. Es ist energieärmer und langwelliger als die Anregungswellenlänge (Stokes-Differenz) [94,95].

Während beim ELISA oder Western-Blot-Verfahren die γ H2AX-negativen, γ H2AX-positiven oder pan-nukleär gefärbten Zellen nicht differenziert werden können, ermöglicht die Durchflusszytometrie anhand der individuellen Intensitätswerte Aussagen zur Verteilung des γ H2AX-Signals innerhalb einer Probe. Darüber hinaus erlaubt diese Hochdurchsatztechnologie durch Färbung weiterer Biomarker die parallele Analyse von Subpopulationen [40].

Immunfluoreszenzanalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die am häufigsten verwendete Methode zur γ H2AX-Analyse ist die Fluoreszenzmikroskopie [72,96]. Hierfür werden Zellen auf Objektträger fixiert und die γ H2AX-Moleküle mit spezifischen Antikörpern analog zur Durchflusszytometrie markiert [91]. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Analyse einzelner DNA-Doppelstrangbrüche, die als fluoreszierende γ H2AX-Foci detektiert werden können (Abb. 1.4.C) [71,77]. Im Gegensatz dazu ist aus der durchflusszytometrisch ermittelten Gesamtintensität einer Zelle keine absolute Quantifizierung der γ H2AX-Foci möglich. Der gemessene Intensitätswert kann aus der Summe mehrerer kleiner Foci oder weniger großer Foci resultieren und zusätzlich von der Auto- bzw. Hintergrundfluoreszenz der Zellen beeinflusst werden [97].

Die mikroskopische γ H2AX-Quantifizierung gilt als sensitivste Methode, da hierbei selbst Zellen mit nur einzelnen schwachen Foci erfasst werden können [91,97,98]. Gleichwohl handelt es sich bei der manuellen Analyse um ein sehr zeitintensives Verfahren, bei welchem die Augen schnell ermüden und bei dem aufgrund der subjektiven Auswertung Abweichungen bei der γ H2AX-Quantifizierung auftreten können [99,100]. Um die mikroskopische Auswertung zu beschleunigen und die Analysebedingungen zu standardisieren, wurden in den letzten fünfzehn Jahren verschiedene Möglichkeiten zur automatisierten γ H2AX-Focus-Analyse entwickelt [99,101–111].

Ein System zur digitalen Evaluation von Immunfluoreszenztests ist die AKLIDES-Plattform der Firma Medipan GmbH. Diese ermöglicht die vollautomatisierte Aufnahme von Immunfluoreszenzbildern und mittels digitaler Mustererkennung die Analyse der γ H2AX-Foci. Das AKLIDES-System wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit für die γ H2AX-Analyse genutzt und validiert.

1.4 Chemotherapeutisch induzierte DNA-Schäden und Ursachen für Arzneimittelresistenzen

1.4.1 Zytostatikainduzierte DNA-Läsionen

Neben den lokal wirkenden chirurgischen und radioonkologischen Behandlungsmethoden neoplastischer Erkrankungen stellt die zytostatische Chemotherapie ein drittes Standardverfahren in der Krebstherapie dar [112].

Die bei der Chemotherapie verwendeten Arzneimittel hemmen je nach Substanzklasse auf unterschiedliche Weise die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen. Zu den klassischen Zytostatika zählen u. a. platinfreie und platinhaltige Alkylantien, die durch Übertragung von Alkylgruppen bzw. von Platinatomen eine Quervernetzung der Nukleotide hervorrufen. Folglich wird durch die Hemmung der DNA-Replikation sowie der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese der Zelltod induziert [112]. Interkalantien erzeugen diese Effekte durch ihre Bindung zwischen die Basenpaare des DNA-Doppelstrangs und der dadurch verursachten nicht-kovalenten Vernetzung [113]. Andere Präparate, wie Antimetabolite, inhibieren die De-novo-Synthese von Nukleotiden oder werden als strukturelle Purin- bzw. Pyrimidinanaloga genutzt, um die Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese zu blockieren [114]. Mitosehemmer beeinflussen hingegen den dynamischen Prozess zwischen Poly- und Depolymerisation der Tubulinfilamente und führen dadurch zur fehlerhaften Ausbildung des Spindelapparates [113].

Ein weiteres Zielprotein sind Topoisomerasen (Top). Diese Enzyme generieren temporäre Einzel- (Top-I) bzw. Doppelstrangbrüche (Top-II), um der Torsionsspannung entgegenzuwirken, die durch Öffnen der DNA-Doppelhelix z. B. bei Transkriptions- und Replikationsprozessen entsteht. Topoisomeraseinhibitoren, wie der Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid, inhibieren anschließend die Verknüpfung der temporären Strangbrüche [112,114]. Bei endokrinsensitiven Tumoren werden darüber hinaus Hormonagonisten bzw. Hormonantagonisten zur Therapie verwendet [112]. Neben den klassischen Zytostatika kommen vermehrt neue molekularpharmakologische Präparate zum Einsatz. Zu diesen Biologika zählen u. a. monoklonale Antikörper oder Kinaseinhibitoren, die zielgerichtet Rezeptoren bzw. spezifische Moleküle in Signaltransduktionskaskaden beeinflussen [114].

1.4.2 ABC-Transporter und Arzneimittelresistenzen

Ein großes Problem bei Chemotherapien ist die hohe interindividuelle Variabilität im Reaktionsverhalten der Patienten [114,115]. Resistenzmechanismen können durch verschiedene intrinsische oder arzneimittelinduzierte Faktoren hervorgerufen werden [116]. Dazu zählen u. a. eine verminderte Bioverfügbarkeit oder Pharmakokinetik der Substanzen im Tumorgewebe, Veränderungen der Zielstrukturen, die vermehrte Bildung von DNA-Reparaturenzymen in Tumorzellen oder die Inhibition von Apoptoseprozessen durch Mutationen in pro-apoptotischen Genen bzw. eine Überexpression von anti-apoptotischen Genen. Eine weitere Ursache für das Auftreten einer sogenannten *Multidrug-Resistenz* (MDR) ist die vermehrte Expression spezifischer Membrantransporter, welche einen verstärkten Medikamentenexport der Zelle bewirken [114,117].

Diese Arzneimittelpumpen zählen zur Familie der *ATP-binding-cassette*(ABC)-Transporter, welche ubiquitär in Pro- und Eukaryoten exprimiert werden. Sie befördern Substrate wie Metabolite, Lipide oder Fremdstoffe aktiv aus der Zelle [115]. Vor allem drei Klassen von ABC-Transportern sind mit der Induktion der MDR bei medikamentösen Tumorthapien assoziiert. Dazu zählen die Transporter ABCB1, auch als P-Glykoprotein (P-gp) oder MDR1 bezeichnet, sowie die Pumpen ABCC1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP-1) und ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) [115,118].

Der am besten charakterisierte ABC-Transporter ist P-gp, welcher starke inter- und intraindividuelle Schwankungen im Expressionslevel aufweist. Darüber hinaus zeigten Studien mit Leukämiepatienten eine Korrelation zwischen dem individuellen P-gp-Expressionsniveau bzw. der P-gp-Aktivität und dem Ansprechen der Chemotherapie [119]. P-gp interagiert mit einer Vielzahl an Substraten, wie beispielsweise mit verschiedenen Antitumormedikamenten (z. B. Etoposide, Daunorubicin, Camptothecin, Imatinib), Antihistaminika, Steroiden oder Fluoreszenzfarbstoffen (Rhodamin-123, Hoechst-33342) [118]. Einige Substanzen besitzen die Eigenschaft, die Bindungstasche der ABC-Transporter zu blockieren oder die für den aktiven Transport notwendigen ATPase-Untereinheiten zu hemmen. Aufgrund des dadurch inhibierten Exports führen diese Modulatoren bzw. *Chemosensibilisatoren* (engl. chemosensitizer) zu einer Akkumulation der ABC-Transporter-Substrate im Zellinneren. Um mittels P-gp-Inhibition die MDR-Mechanismen von Tumorzellen zu überwinden, wurden bereits mehrere Generationen an Chemosensibilisatoren entwickelt und getestet [120,121]. Noch fehlen jedoch klinisch einsetzbare P-gp-Modulatoren, die nicht systemisch toxisch, aber dennoch ausreichend effektiv gegen die Tumorzellen wirken. An deren Synthese und Evaluation wird derzeit weiter gearbeitet [122].

1.5 DNA-Schäden in der medizinischen Radiologie

1.5.1 Ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung bei der medizinischen Bildgebung

Der Mensch ist täglich einer Vielzahl natürlicher Strahlenquellen, z. B. kosmischer oder terrestrischer Strahlung sowie radioaktiven Kohlenstoffelementen oder Radon ausgesetzt, die von außen oder nach Nahrungsaufnahme bzw. Inhalation von innen auf die Zellen des Körpers wirken [123]. Abhängig davon, ob die übertragene Photonenenergie ausreichend ist, um eine Ionisation von Atomen zu bewirken, wird die Photonen- bzw. elektromagnetische Wellenstrahlung in zwei Hauptgruppen unterteilt, die Klasse der nicht-ionisierenden und die der ionisierenden Strahlung [124]. Die in Hertz (Hz) angegebene Frequenz der elektromagnetischen Wellen bezeichnet die Anzahl der Schwingungen pro Sekunde. Sie beeinflusst deren Wellenlänge und Photonenenergie sowie die daraus resultierende Wirkung [124]. Anhand der Frequenz lassen sich weitere Bereiche und Anwendungsgebiete unterteilen, siehe Abb. 1.5.

Die optische Strahlung umfasst sichtbares Licht mit einer Wellenlänge zwischen ca. 400 – 800 nm sowie Infrarotstrahlung und ultraviolette (UV) Strahlung [125]. Sie zählt zusammen mit den längerwelligen, energieärmeren elektromagnetischen Feldern (EMF) zur Gruppe der nicht-ionisierenden Strahlung. Letztere lassen sich u. a. wiederum in den Hochfrequenzbereich (Mikro-, Funkwellen), den Niederfrequenzbereich (Wechselstrom) und den statischen Bereich (getrenntes magnetisches und elektrisches Feld) unterteilen [124,126].

Ein Teil des UV-Lichts und kurzwelligere elektromagnetische Wellen wie Röntgen- oder Gammastrahlung werden als ionisierende Strahlung klassifiziert. Sie können aufgrund ihrer hohen Energie chemische Bindungen direkt beeinflussen und zur Ionisierung und Radikalbildung beitragen [125]. Im Gegensatz zur Teilchenstrahlung (α -, Neutronen-, Ionenstrahlung) wirken Röntgen- und Gammastrahlung überwiegend (65 – 70 %) auf indirektem Wege. Dabei werden die Schäden nicht im Biomolekül direkt hervorrufen, sondern durch lokale Sekundärreaktionen mit Radikationen verursacht, die zuvor über Wasserradiolyse gebildet wurden [127]. Nicht-ionisierende elektromagnetische Felder können indes im Niederfrequenzbereich eine Reizwirkung auf Muskeln- oder Nervenzellen ausüben oder im Hochfrequenzbereich durch die Energieabsorption eine Erwärmung z. B. in Gewebe induzieren.

Im Zuge technischer Entwicklungen, u. a. durch Medizin- oder Nukleartechnik sowie durch Hochspannungsleitungen oder Rund- und Mobilfunk, steigt die Exposition künstlich erzeugter elektromagnetischer Wellen auf den Menschen stetig an [123,128].

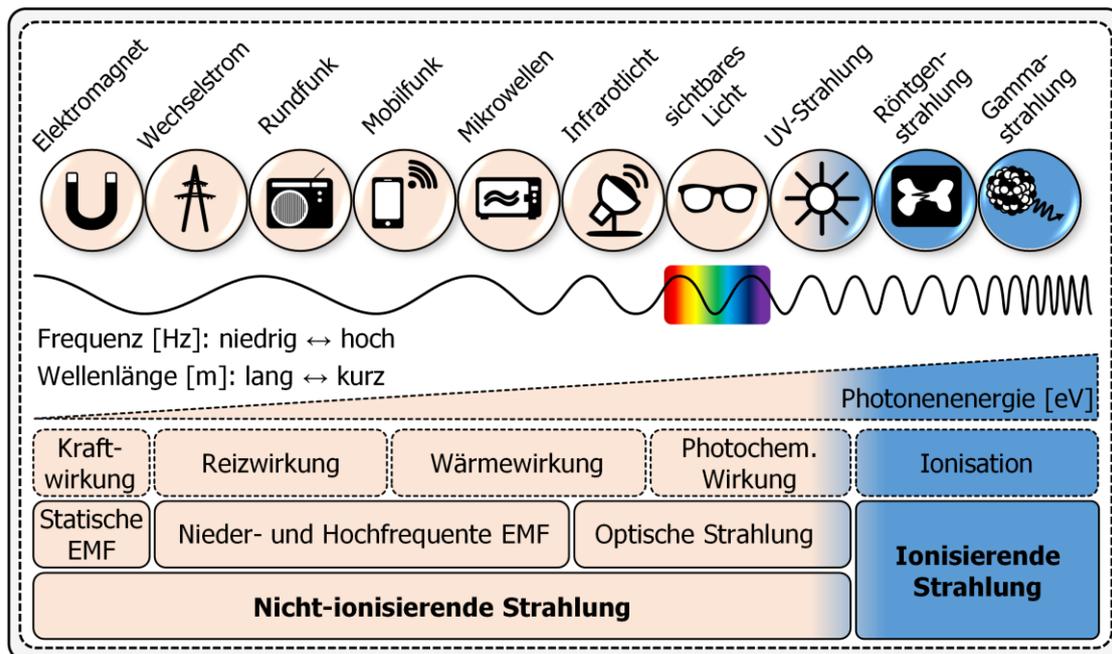


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des elektromagnetischen Spektrums

Die Frequenz der elektromagnetischen Wellen beeinflusst deren Wellenlänge und Photonenenergie. Je nach Frequenzbereich der elektromagnetischen Felder (EMF) lassen sich unterschiedliche Auswirkungen und Anwendungsgebiete unterscheiden. Abhängig von der Photonenenergie und der Fähigkeit, Atome direkt ionisieren zu können, werden elektromagnetische Wellen in nicht-ionisierende und ionisierende Strahlung unterteilt. Details siehe Kapitel 1.5. Abbildung erstellt in Anlehnung an: [124,294,295].

Für die Diagnostik, zur Vorsorge oder zur Beurteilung des Therapieverlaufs, aber auch zur intraoperativen Überwachung sind Bilder vom Inneren des Körpers in der Humanmedizin unerlässlich. Im letzten Jahrhundert wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Bildgebungsverfahren etabliert, die mittlerweile routinemäßig in der Klinik angewandt werden [129]. Die zur Bildaufnahme genutzten elektromagnetischen Wellen unterscheiden sich je nach Verfahren in ihrem Frequenzbereich, wodurch die Darstellung des zu untersuchenden Objekts, aber auch die Strahlenexposition des Patienten, beeinflusst wird.

Bildgebungsverfahren wie Endoskopie oder Mikroskopie beruhen auf Lichtwellen, während röntgenografische Techniken, wie die klassische Röntgenprojektion, die Mammographie oder das Schnittbildverfahren bei der Computertomographie (CT), ionisierende Strahlung nutzen [129]. Ionisierende Strahlung wird neben den morphologischen Untersuchungsmethoden auch in funktionellen nuklearmedizinischen Bildgebungstechniken wie der Szintigraphie, Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eingesetzt. Hier werden Stoffwechselpräparate injiziert, die mit instabilen Radionukliden markiert sind. Ihre Anreicherung sowie ihr zeitlicher Aktivitätsverlauf können über die emittierten Zerfallsquanten detektiert werden, wodurch

Rückschlüsse auf biochemische Funktionen und Stoffwechselprozesse im Körper zugelassen werden können [129]. Im Gegensatz dazu nutzen Methoden wie Infrarot-Thermographie oder Magnetresonanztomographie (MRT oder Kernspintomographie) nicht-ionisierende elektromagnetische Felder [130,131]. Die Sonographie verwendet ebenfalls keine ionisierende Strahlung, sondern basiert auf der Detektion von Ultraschallwellen [130].

1.5.2 Magnetresonanztomographie

Ein bedeutendes nicht-invasives Bildgebungsverfahren in der Routinediagnostik ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Sie ermöglicht morphologische, aber auch funktionelle und biochemische Untersuchungen von Gewebeeigenschaften [131]. Im Gegensatz zu röntgenografischen Verfahren wie der Computertomographie werden bei der MRT keine ionisierenden Strahlenquellen, sondern drei unterschiedliche nicht-ionisierende elektromagnetischen Feldern genutzt. Dazu zählen ein statisches Magnetfeld (B_0) mit 0 Hz, dessen Magnetfeldstärke in Tesla (T) angegeben wird, Gradientenfelder im kHz-Bereich sowie ein Hochfrequenzfeld im MHz-Bereich [131,132].

Grundlage der Magnetresonanztomographie ist die Rotation (Spin) gebundener Wasserstoffatome, genauer Wasserstoffprotonen, die vorwiegend in Weichteilen und weniger in Knochen lokalisiert sind [133]. Die Anwendung eines starken statischen Magnetfelds (B_0) bewirkt eine makroskopische Magnetisierung der Wasserstoffkerne, wodurch sich diese mit der Rotationsachse entlang des einwirkenden B_0 -Felds ausrichten und zur Präzession (Kreisbewegung) gebracht werden. Durch Impulse eines senkrecht zum B_0 -Feld gerichteten Hochfrequenzfelds (B_1 ; Radiofrequenzfeld), mit gleicher Präzessionsfrequenz wie die magnetisierten Wasserstoffkerne (Resonanzbedingung), werden die Protonen aus der Gleichgewichtslage gekippt [130,131]. Nach Abstellen der Hochfrequenzimpulse kehren die Wasserstoffprotonen in ihren Ausgangszustand zurück (Relaxation). Die jeweilige Relaxationszeit ist dabei abhängig von der Molekülstruktur und -umgebung im Gewebe [130]. Die während der Relaxation freiwerdende Energie kann in Form von Hochfrequenz-Signalen detektiert werden. Eine zusätzliche Überlagerung mit Gradientenfeldern entlang von zwei oder drei Raumrichtungen (G_x , G_y , G_z) ermöglicht die Ortskodierung. Nach Rekonstruktion der Signale werden Aufnahmen erzeugt, welche Rückschlüsse auf die Lokalisation und die Konzentration der Protonen im untersuchten Gewebe zulassen [130,131]. Durch besonders schnelles Schalten der Gradientenfelder beim sogenannten Echo-Planar-Imaging (EPI) können Bilder bereits in weniger als 100 ms generiert werden [131,133].

In der Klinik werden derzeit insbesondere Hochfeld-MRTs mit Magnetfeldstärken (SMF) zwischen 1 – 3 T genutzt. Da sich das Signal-Rausch-Verhältnis nahezu proportional zur SMF verhält, wurden zur Verbesserung der Bildqualität Ultrahochfeldscanner mit SMF von ≥ 7 T

konstruiert. Diese Systeme dürfen derzeit jedoch nur für Forschungszwecke bzw. im Rahmen klinischer Studien genutzt werden [134]. Aus dem Einsatz von MRT-Systemen mit höheren B_0 -Feldern und ihrer Kombination mit den entsprechenden Hochfrequenz- und Gradientenfeldern resultiert, ohne entsprechende Anpassungen, eine erhöhte Energieübertragung an das untersuchte Gewebe. Die übertragene Energie des Hochfrequenzfeldes wird als spezifische Absorptionsrate (SAR) angegeben [132,133]. Um Schäden durch die induzierte Erwärmung zu vermeiden, gelten international festgelegte SAR-Grenzwerte.

Im Gegensatz zu röntgenografischen Verfahren konnte derzeit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer MRT-Exposition und induzierten DNA-Schäden nachgewiesen werden, weshalb die MRT derzeit als nicht-genotoxisches Bildgebungsverfahren gilt [131,135]. Sie wird, wenn möglich, als sicherere Alternative zum CT insbesondere für Kinder und Schwangere verwendet und übernimmt zunehmend ehemalige Applikationen der CT. In den letzten Jahren wurden jedoch Studien veröffentlicht, die eine Zunahme von DNA-Läsionen in humanen Lymphozyten auch nach In-vitro- bzw. In-vivo-MRT-Exposition beschrieben [136–139]. In anderen Studien konnte hingegen keine Induktion von DNA-Schäden nach MRT-Untersuchung beobachtet werden [140,141].

Das Fehlen eindeutiger Ergebnisse zur Bewertung des genotoxischen Potentials nicht-ionisierender Strahlung, die stetig steigende Anzahl jährlich durchgeführter MRT-Untersuchungen sowie die Entwicklung immer leistungsfähigerer MRT-Scanner (≥ 7 T), brachten neue Sicherheitsbedenken gegenüber dieser Technologie hervor. Internationale Gremien, wie die Weltgesundheitsorganisation (WHO), das Europäische Parlament oder die Internationale Kommission zum Schutz vor nicht-ionisierender Strahlung (ICNIRP) forderten zur Risikobewertung sowie zur Erstellung von neuen Grenzwertempfehlungen und Normen dringend Studien bezüglich MRT-induzierter biologischer Effekte [132,142,143]. Während bereits einige Studien kurzzeitige biologische Auswirkungen bei Probanden, wie Übelkeit, Schwindel oder einen metallischen Geschmack, beschrieben, fehlen aktuell eindeutige Ergebnisse über den Nachweis von genotoxischen Schäden infolge klinischer Hochfeld-MRT-Untersuchungen [144,145]. Daten von In-vitro- oder In-vivo-Studien über DNA-Schäden im Zusammenhang mit der 7 T-Ultrahochfeld-MRT wurden, bis auf die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, bislang noch nicht veröffentlicht.

2 Zielstellung der Arbeit

Die mikroskopische Erfassung von γ H2AX-Foci nach Immunfluoreszenzfärbung gilt derzeit als das sensitivste Verfahren zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. Gleichwohl stellt die manuelle Auszählung ein sehr zeitintensives und subjektives Verfahren dar. Um für potentielle Anwendungen in der Routinediagnostik eine beschleunigte Auswertung und die notwendige Standardisierung von Immunfluoreszenztests zu ermöglichen, wurde von der Medipan GmbH die AKLIDES-Plattform entwickelt und für die automatisierte γ H2AX-Analyse erweitert. Dieses Gerätesystem verknüpft in einem sequenziellen Prozess Bildaufnahme, Bildverarbeitung, Bildanalyse und Ergebnisausgabe.

Ein Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, das AKLIDES-System in Bezug auf die mögliche Nutzung zur vollautomatisierten γ H2AX-Analyse zu validieren und dieses Verfahren mit der manuell durchgeführten γ H2AX-Quantifizierung sowie anderen Nachweismethoden zur γ H2AX-Bestimmung zu vergleichen. Als Zellsystem dienten dabei unstimulierte humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes und als Modellschädele zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde das Zytostatikum Etoposid genutzt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, potentielle Anwendungen des automatisierten γ H2AX-Immunfluoreszenztests zu prüfen. Neben der Genotoxizitätsanalyse verschiedener Klassen immunsuppressiv wirkender Medikamente sollte die Eignung der γ H2AX-Analyse als Chemosensitivitätstest untersucht werden. Hierzu wurde der Einfluss von ABC-Transporter-Inhibitoren auf die Stärke zytostatikainduzierter DNA-Doppelstrangbrüche analysiert.

Während im Bereich der medizinischen Bildgebung gezeigt werden konnte, dass röntgenografische Verfahren DNA-Schäden hervorrufen, fehlen bislang eindeutige Studien, die das genotoxische Potential der Magnetresonanztomographie beschreiben. Daher sollte im Rahmen einer In-vitro- und einer In-vivo-Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bzw. γ H2AX-Foci in mononukleären Zellen und der (Ultra-)Hochfeld-MRT-Exposition analysiert werden. Neben der Betrachtung möglicher transienter Effekte durch dieses diagnostische Bildgebungsverfahren wurde in einer weiteren Studie zusätzlich mittels γ H2AX-Assay und Mikronukleustest die DNA-Integrität von Probanden untersucht, die einer häufigen 7 T-MRT-Exposition ausgesetzt waren.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Hersteller/Vertrieb
• 2-Mercaptoethanol	Merck
• Acrylamid (29:1; 30 % w/v)	AppliChem
• Ammonium Persulfat (APS, 10 %; 0,1g/ml)	Roth
• Biocoll Separationsmedium	Biochrom
• Bromphenolblau	Roth
• Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V)	AppliChem
• Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
• DPX Mountant für Histologie	Sigma Life Science
• Eindeckmedium mit DAPI (5 µg/ml)	Medipan
• Essigsäure (≥ 99 %)	Roth
• Fötale Kälberserum (FCS)	Pan Biotec
• Formaldehyd-Lösung (4,0 %)	Fischar
• Glycerol	Roth
• Glycin für Molekularbiologie	AppliChem
• Gurr Puffer Tabletten	Gibco
• Heparin (5000 Units/ml)	Biochrom
• Kaliumchlorid (KCl)	Roth
• Magermilchpulver	Roth
• Methanol (≥ 99 %)	Roth
• Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem
• Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
• Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS)	ICN Biomedicals
• Natriumfluorid (NaF)	Sigma
• PBS Dulbecco, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (1x Lösung steril)	Biochrom
• PBS Dulbecco, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Pulver)	Biochrom
• Penicillin (10.000 µg/ml) + Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco
• RPMI 1640 Medium (mit 2,0 g/L NaHCO ₃ , Glutamin)	Biochrom
• Sammelgelpuffer (Stacking Gel Buffer)	Bio-Rad
• TEMED	Sigma
• TGS (10-fach konzentriert)	Bio-Rad
• Trenngelpuffer (Resolving Gel Buffer)	Bio-Rad
• Tris für Molekularbiologie	AppliChem
• Triton X-100	Sigma-Aldrich

3.1.2 Farb- und Detektionsstoffe, Analyse-Kits

Substanz	Hersteller/Vertrieb
• ³ H-Thymidin	MP Biomedicals
• CellTiter-Blue Viabilitätstest	Promega
• DAPI	Roth
• ECL Western Blotting Substrate	Pierce
• Giemsa Stain KaryoMAX	Gibco
• PI/RNase Färbepuffer	BP Biosciences
• Rhodamine-123	Sigma
• Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich

3.1.3 Antikörper

Spezifität	Spezies/Klon	Hersteller/Vertrieb
• Anti-phospho-Histone H2A.X (Serin-139)	Maus (monoklonal) Klon: JBW301	Millipore
• Anti-beta-Actin	Maus (monoklonal)	Sigma
• Anti-Maus-IgG-Alexa488	Ziege (polyklonal)	Life technologies
• Anti-Maus-IgG-HRP	Esel (polyklonal)	Dianova
• Maus-IgG ₁ Isotypkontrolle	Maus	Dako

3.1.4 Pharmakologische Substanzen, Inhibitoren und Mitogene

Substanz	Hersteller/Vertrieb
• Anti-TNF- α (Golimumab)	MSD Sharp & Dohme
• Camptothecin (CPT)	Abcam
• Cytochalasin B	Sigma-Aldrich
• Cyclosporin A (CsA)	Sigma-Aldrich
• Cytarabin (AraC)	Sigma-Aldrich
• Daunorubicin (DNR)	Sigma-Aldrich
• Dexamethason (Dexa)	Sigma-Aldrich
• Etoposid (ETP)	Sigma-Aldrich
• Gadovist® (Gadobutrol, Gd-DO3A-butrol)	Bayer Healthcare
• Phytohämagglutinin (PHA)	Gibco
• Rapamycin (Rapa)	Sigma-Aldrich
• TGF- β_1	R&D Systems

3.1.5 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Nährmedium

Zellkulturmedium	
• 500 ml	RPMI 1640
• 50 ml	FCS (hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C)
• 5 ml	Penicillin (10.000 $\mu\text{g/ml}$) + Streptomycin (10.000 $\mu\text{g/ml}$)

Immunzytochemie

Waschpuffer	
• 1x	PBS (Pulver; 9,55 g/l)

Blockierungspuffer	
• 1x	PBS (Pulver; 9,55 g/l)
• 1 %	BSA (10 g/l)

Durchflusszytometrie

Waschpuffer	
• 1x	PBS (Pulver; 9,55 g/l)
• 0,5 %	BSA (5 g/l)

Blockierungspuffer	
• 1x	PBS (Pulver; 9,55 g/l)
• 1 %	BSA (10 g/l)

Western-Blot

Probenpuffer (5-fach)		
• 2,5 ml	Sammelgelpuffer	} Stock (900 µl)
• 2 ml	Glycerol	
• 2 ml	20-prozentiges SDS	
• 0,2 ml	1-prozentiges Bromphenolblau	
• 2,3 ml	Aqua dest.	
• 1 ml	2-Mercaptoethanol	frisch (100 µl)

Trenngellösung (12,5 %)	
• 6,67 ml	Aqua dest.
• 5 ml	Trenngelpuffer
• 8,34 ml	30-prozentiges Acrylamid
• 66 µl	10-prozentiges APS
• 20 µl	TEMED

Sammelgellösung	
• 5,3 ml	Aqua dest.
• 2,5 ml	Sammelgelpuffer
• 1,5 ml	30-prozentiges Acrylamid
• 0,5 ml	Glycerol
• 30 µl	10-prozentiges APS
• 10 µl	TEMED

Laufpuffer	
• 1x	TGS (Tris-Glycin-SDS)

Transferpuffer	
5,86 g	Glycin
11,62 g	Tris
3,75 ml	20-prozentiges SDS
1600 ml	Aqua dest.
400 ml	Methanol

Waschpuffer	
• 1x	Tris-gepufferte Salzlösung (TBS); pH 7,5 (+ HCl) aus 10-fachem TBS-Stock
• 60,56 g	Tris
• 175,32 g	NaCl
• 2000 ml	Aqua dest.
	} 10x TBS-Stock

Blockierungspuffer	
• 5 %	Milchpulver (0,5 g pro 10 ml 1x TBS)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Vertrieb
• 6-Well-Objekträger, silanisiert	Medipan
• 12-Well-Objekträger, silanisiert	Medipan
• 12-, 24- bzw. 48-Loch-Zellkulturplatte (Flachboden, steril)	Costar
• 96-Loch-Mikrotiterplatte (MTP; Flachboden, steril)	TPP
• Deckgläschen (24 x 60 mm)	Menzel
• Bedruckte Filtermembran A	Perkin Elmer
• Filterpapier	Munktell
• Heparin-beschichtete Blutabnahmeröhrchen (REF 367876)	BD Diagnostics
• Lumineszenzfilm: High performance chemiluminescence film	GE Healthcare
• Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
• Objekträger, unbeschichtet	Menzel
• Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, 10 – 250 kDa	Thermoscientific
• Szintillator Meltilex A	Perkin Elmer
• Zentrifugenröhrchen – 1,5 ml	VWR
• Zentrifugenröhrchen – 15 ml und 50 ml	Greiner

3.1.7 Geräte und Software

Gerät zur medizinischen Bildgebung oder Gammabestrahlung	Hersteller/Vertrieb
• 1 T-MRT – Philips Panorama	Philips Healthcare
• 1,5 T-MRT – Philips Intera	Philips Healthcare
• 3 T-MRT – Philips Achieva	Philips Healthcare
• 7 T-MRT – Siemens Magnetom	Siemens Healthcare
• CT – Toshiba Aquilion Prime	Toshiba Medical Systems
• CT – Siemens Somatom Definition AS	Siemens Medical Systems
• Gammabestrahlungsanlage – Biobeam 8000 (^{137}Cs ; 2,8 Gy/min)	Gamma-Service Medical

Laborgerät/-apparatur	Hersteller/Vertrieb
• Blotter Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad
• Cell-Harvester	Inotech
• Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR	CAWO
• Färbeküvette	Glaswerk Wertheim
• Feinwaage	Sartorius
• Inkubator Steri-cult 200-Incubator	Forma Scientific
• Plattformschüttler wippend, Duomax 2030	Heidolph
• Protein-Elektrophorese-System	Bio-Rad
• Stromversorgungsgerät – PowerPac 300	Bio-Rad
• Zentrifuge – Biofuge fresco	Heraeus
• Zentrifuge – Centrifuge 5415D	Eppendorf
• Zentrifuge – Multifuge 3 S-R	Heraeus
• Zentrifuge – Rotantal TR	Hettich

Detektionsgerät + dazugehörige Analysesoftware	Hersteller/Vertrieb
<ul style="list-style-type: none"> AKLIDES + AKLIDES-Nuk Software LED: $\lambda_1$380 nm (DAPI); $\lambda_2$470 nm (γH2AX); $\lambda_3$535 nm; $\lambda_4$635 nm Filter blau (DAPI): Ex. BP 387 14 nm; Em. 433 40 nm Filter grün (γH2AX): Ex. BP 480 32 nm; Em. 530 44 nm Objektiv: Olympus, semi-apochromat LUCPLFLN 60x, NA: 0,7 	Medipan
<ul style="list-style-type: none"> Epifluoreszenzmikroskop + Spot Advanced Software Filter blau (DAPI): Ex. BP 360 40 nm; Em. 470 40 nm Filter grün (γH2AX): Ex. BP 480 40 nm; Em. 527 30 nm Objektiv: 63x, Öl, numerische Apparatur (NA): 1,4 	Leica; SPOT Imaging Solutions
<ul style="list-style-type: none"> BD FACSCalibur + Cell Quest Pro Software FL rot, FL2 (PI): Ex. 488 nm Laser; Filter: BP 585 42 nm 	Becton Dickinson
<ul style="list-style-type: none"> BD LSRFortessa + BD FACSDiva Software FL blau (DAPI): Ex. 405 nm Laser; Filter: BP 450 50 nm FL grün (γH2AX): Ex. 488 nm Laser; Filter: BP 530 30 nm 	Becton Dickinson
<ul style="list-style-type: none"> Coulter Ac-T diff2 	Beckman Coulter
<ul style="list-style-type: none"> Kodak Image Station 2000R + 1D Image Analysis Software 	Kodak
<ul style="list-style-type: none"> Tecan Reader Safire + Magellan Software 	Tecan Austria; Magellan
<ul style="list-style-type: none"> Wallac MicroBeta TriLux Scintillation Counter 	Perkin Elmer

Softwareprogramm	Hersteller/Vertrieb
• FlowJo 7.6.4	Treestar
• Flowing Software 2	Perttu Terho
• GraphPad Prism 5.01	Graph Pad Software
• Matlab R2012b	MathWorks
• MS Office (Word, Excel, Powerpoint) Version 2013	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut

Peripheres Vollblut wurde von gesunden Spenderinnen und Spendern durch Venenpunktion gewonnen und das entnommene Blut zur Gerinnungshemmung im Verhältnis 2:1 mit heparinhaltigem RPMI 1640-Medium (5 U Heparin/ml) versetzt. Die Blutabnahme bei der MRT-In-vivo-Studie (siehe Kapitel 4.7.2) erfolgte mit heparinbeschichteten Blutabnahmeröhrchen. Das gewonnene Vollblut wurde anschließend 1:1 mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) verdünnt. Zur Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Biocoll-Polysaccharoselösung (Dichte: 1,077 g/ml; Zentrifugation: 30 min bei 1540 rpm (490×g), 18 °C, Bremse Stufe 2) [87]. Die angereicherten mononukleären Zellen (MNZ) im Interphasering wurden abgenommen, zweifach in RPMI gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei 500×g) und in Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die MNZ wurden entweder direkt weiterverwendet oder in einer Zellkulturflasche im Inkubator bei 37°C, 7 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 93 % kultiviert.

3.2.2 Behandlung von MNZ mit pharmakologischen Substanzen

Die isolierten MNZ wurden je nach Versuch und benötigter Zellzahl in 48-, 24- bzw. 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und die zu untersuchenden pharmakologischen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen in die jeweiligen Vertiefungen (Wells) pipettiert (Kapitel 4.4). Die Behandlung erfolgte bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Als Modellsubstanz für arzneimittelinduzierte DNA-DSB wurde in dieser Arbeit das Zytostatikum Etoposid (ETP) verwendet. Bei Untersuchungen zum DNA-Reparaturverhalten nach Etoposid-Entfernung wurden die Zellen nach entsprechender Inkubationszeit entnommen, zentrifugiert (200×g, 12min) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert (Kapitel 4.2.2, 4.3, 4.5.2, 4.7.3). Die anschließend erneut ausplattierten Proben wurden in den Inkubator gestellt und die DNA-Reparatur zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert.

3.2.3 Exposition von MNZ gegenüber elektromagnetischer Strahlung

Bestrahlung mononukleärer Zellen mit Gammastrahlen (*in vitro*)

Die MNZ wurden steril in konische 15 ml- bzw. 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei Raumtemperatur in eine Gammabestrahlungsanlage platziert (¹³⁷Cs; 2,8 Gy/min) und bei 22 °C mit einer Dosis zwischen 0,2 – 30 Gy bestrahlt. Während des Rücktransports zum Labor erfolgte die Lagerung der Proben auf Eis. Anschließend wurden die Zellen ausplattiert und im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Die Analyse initialer γH2AX-Foci erfolgte 1 h nach Bestrahlung und die der DNA-Reparaturkinetik im Zeitraum von 1 – 24 h nach Exposition.

Exposition mononukleärer Zellen gegenüber Röntgenstrahlung im CT (*in vitro*)

Bei den in Kapitel 4.7.1 beschriebenen In-vitro-Versuchen wurden die isolierten MNZ in Zentrifugenröhrchen überführt, diese im CT mittig platziert und ein Spiral-CT durchgeführt. Dabei wurde ein konstantes elektrisches Potential von 120 kV, eine Stromstärke von 200 mA mit einem Aluminiumfilter von 3 mm (Toshiba CT) bzw. 6,8 mm (Siemens CT) sowie eine Rotationszeit von 0,5 s angewendet. Die Durchführung der CT-Scans erfolgte durch Dr. med. Björn Friebe aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des Klinikums der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg A. ö. R. (OvGU).

Exposition mononukleärer Zellen gegenüber 7 T-Ultrahochfeld-MRT (*in vitro*)

Die Exposition der MNZ im 7 T-MRT (Kapitel 4.7.1, 4.7.3) erfolgte jeweils für 1 h in einem Ganzkörper-MR-Scanner mit einem statischen Magnetfeld (B_0) von 7 T, einer maximalen Gradientenstärke von 70 mT/m und einer maximalen Gradientenanstiegszeit (engl. slew rate) von 200 mT/m/ms. Bei Messungen, die nicht nur im reinen statischen Magnetfeld, sondern unter Verwendung der EPI-Sequenz (Echo Planar Imaging) durchgeführt wurden, erfolgte die Exposition der Proben in eine 8-Kanal-Kopfspule. Die Parameter waren wie folgt eingestellt: 7900 ms Repetitionszeit (engl. repetition time, TR), 22 ms Echozeit (engl. echo time, TE), 80° Pulswinkel (engl. flip angle), 0,8 mm × 0,8 mm × 1,5 mm Volumenelement/Voxelgröße, 100 Schichten. In allen durchgeführten 7 T-MRT-Expositionen befanden sich die Proben im Umkreis von 1 – 7 cm zum Isozentrum.

Um den potentiellen Einfluss der 7 T-MRT auf DNA-Schäden zu maximieren, wurde in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu den In-vivo-Analysen, bei den In-vitro-Untersuchungen die EPI-Sequenz so angepasst, dass sie annähernd die maximal zulässige Stärke an Radiofrequenz- und Gradientenpulsen und somit die maximale SAR erreichte. Die eingesetzte maximale Gradientenstärke betrug 65,43 mT/m, die maximale Gradientenanstiegszeit 186 mT/m/ms und die Auslese (engl. read out)-Gradientenstärke 35,33 mT/m. Die Durchführung der 7 T-MRT-Scans bei den In-vitro-Untersuchungen erfolgte unter Leitung von Frau Mahsa Fatahi aus der Abteilung für Biomedizinische Magnetresonanz des Instituts für Experimentelle Physik der OvGU.

Durchführung von CT-Untersuchungen (*in vivo*)

Bei der in Kapitel 4.7.2 beschriebenen In-vivo-Studie wurde an 10 Patientinnen und Patienten der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der OvGU nach Standardprotokoll eine CT-Untersuchung durchgeführt. Aus medizinischer Indikation wurden fünf der zehn Patienten nativ, die anderen fünf unter Zugabe von jodhaltigem Kontrastmittel (80–120 ml Imeron 300; Bracco Imaging) behandelt. In beiden CT-Untergruppen erhielten jeweils zwei Patienten ein CT des Thorax und drei Patienten ein CT des Abdomens. Die Patientenaufklärungen, Blutabnahmen und CT-Untersuchungen erfolgten durch Dr. med. Björn Friebe.

Durchführung von MRT-Untersuchungen (*in vivo*)

Bei der in Kapitel 4.7.2 beschriebenen In-vivo-Studie wurde 30 Patientinnen und Patienten der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der OvGU nach Standardprotokoll am 1 T-, 1,5 T- und 3 T-MRT untersucht. Aus medizinischer Indikation wurde der einen Hälfte der Patienten gadoliniumhaltiges Kontrastmittel verabreicht (0,1 mmol/kg Körpergewicht Gadobutrol, Gadovist®), die MRT-Scans der anderen Hälfte wurden nativ durchgeführt. Die Bildaufnahmen der Patienten am 7 T-MRT erfolgten im Rahmen einer weiteren klinischen Studie ohne Gabe von Kontrastmittel. In Tabelle 4.2 sind detaillierte Angaben zur Energieabsorption bei den jeweiligen MRT-Protokolle aufgeführt. Die Patientenaufklärungen, Blutabnahmen und MRT-Untersuchungen erfolgten durch Dr. med. Björn Friebe.

3.2.4 Immunzytochemische Färbung von γ H2AX-Foci

Zur zytochemischen γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung der MNZ wurde ein Testkit der Medipan GmbH genutzt und die Färbung entsprechend der Herstellerangaben sowie dem Protokoll von Redon et al. [91] mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die MNZ wurden zum angegebenen Untersuchungszeitpunkt in 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit $200\times g$ für 12 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands und Resuspension des Zellpellets in PBS (Zellkonzentration: $2\cdot 10^6$ Zellen/ml) wurden 25 μ l der Zellsuspension pro Auftragsfläche auf einen silanisierten Glasobjektträger transferiert und die Zellen 10 min sedimentieren gelassen. Anschließend erfolgte für 15 min eine Fixierung in Formaldehyd (1 %), bevor die Objektträger dreimal für je 10 min in einer PBS-gefüllten Küvette gewaschen wurden. Um eine intranukleäre Färbung zu ermöglichen, wurden die Lipidmembranen der Zellen mit 0,1 % Triton-X 100, verdünnt in Blockierungspuffer, für 5 min auf Eis irreversibel permeabilisiert und die Objektträger anschließend dreimal in Blockierungspuffer gewaschen. Für die Färbung mit dem γ H2AX-Primärantikörper wurden 25 μ l einer 1:2000-Verdünnung (0,5 μ g/ml) auf jedes Well gegeben und die Proben für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreifachem Waschen in Blockierungspuffer erfolgte die Färbung mit dem 1:2000-verdünnten (1 μ g/ml) Sekundärantikörper, ebenfalls für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 10 min wurden die Objektträger luftblasenfrei mit 7 μ l DAPI-haltigem Eindeckmedium und einem Deckgläschen bedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt.

Nach der γ H2AX-Färbung erfolgte die mikroskopische Auswertung (siehe Kapitel 3.2.5). Eine vereinfachte Darstellung der Probenaufbereitung ist in Abb. 3.1 A gezeigt.

Bei Kinetikuntersuchungen wurden die Zellen zum angegebenen Zeitpunkt fixiert und danach die Wells mit PBS beschichtet. Die Objektträger lagerten bei 4 °C im Kühlschrank, bis nach maximal 24 h die letzten Proben des Versuchs aus dem Inkubator entnommen und fixiert wurden. Dann erfolgte parallel die Permeabilisierung und Färbung aller Proben.

3.2.5 Analyse von γ H2AX-Foci in humanen mononukleären Zellen

Manuelle Auswertung

Nach der immunzytochemischen γ H2AX-Färbung wurden bei der manuellen Auswertung die Zellen der Objektträger mithilfe eines aufrechten Epifluoreszenzmikroskops (Leica) und eines Öl-Objektives mit 63-facher Vergrößerung analysiert. Hierzu wurden die DAPI-gefärbten Nuklei im blauen Fluoreszenzkanal mit einer Extinktion von 360 nm angeregt, die Zellkerne fokussiert und anhand ihrer Morphologie 100 runde, aufeinanderfolgende Nuklei ausgewählt. Diese wurden in ihrer gesamten Tiefe, d. h. entlang der Z-Ebenen, im grünen Fluoreszenzkanal mit einer Anregungswellenlänge von 480 nm untersucht und die Anzahl der γ H2AX-Foci erfasst. Zur Bildaufnahme wurde die Software Spot Advanced genutzt.

Neben der direkten Quantifizierung der DSB durch das Okular am Mikroskop wurden auch aufgenommene Bilder hinsichtlich ihrer Anzahl an γ H2AX-Foci ausgewertet. Dazu wurden die am AKLIDES-System generierten Z-Stapel-Bilder, welche die Aufnahmeserie aller Z-Ebenen einer XY-Position vereinen, verwendet. Die analysierten Zellen wurden anhand ihrer Morphologie in der DAPI-Aufnahme ausgewählt und stark veränderte Zellen sowie Monozyten und Granulozyten anhand ihrer Größe aus der Auswertung ausgeschlossen.

Automatisierte Auswertung

Für die automatisierte γ H2AX-Analyse der Objektträger wurde die digitale Mikroskopieplattform AKLIDES der Medipan GmbH genutzt. Das Gerätesystem basiert auf einem motorisierten inversen Epifluoreszenzmikroskop (Olympus IX81, Olympus) mit einem Objektiv mit 60-facher Vergrößerung. Zusammen mit anderen Hardwaremodulen, wie einer 400 nm und einer 490 nm lichtemittierenden Diode (LED; pE-2, CoolLED), Multibandfiltern (DA/FI-A, Semrock), einer ladungsträgergekoppelten (engl. charge-coupled device, CCD) Graustufenkamera (DX4, Kappa optronics) sowie einem motorisierten Probentisch, wurde das Mikroskop vollständig über einen angeschlossenen Computer gesteuert (Abb. 3.1 B).

Die automatisierte Untersuchung der Bilder am AKLIDES-System umfasste einen sequenziellen Prozess aus Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Bildanalyse. Nach Probenzuordnung und Messbeginn wurden die einzelnen Auftragsstellen der Objektträger anhand ihrer XY-Position lokalisiert und angesteuert. Mikroskopiebilder wurden in zwei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen (FL) erzeugt. Zuerst erfolgte die Aufnahme der Zellnuklei mit einem 60x-Objektiv im blauen DAPI-Kanal. Hierbei ermöglichte eine Autofokussierung, basierend auf Texturanalyseverfahren nach Haralick, die exakte Detektion der Fokusebene der Zellkerne [146].

Nach der Aufnahme des 2-dimensionalen DAPI-Bildes erfolgte die Analyse derselben Position im grünen γ H2AX-Kanal. Hierzu wurden fünf Aufnahmen in unterschiedlichen

Z-Ebenen generiert, d. h. in der ursprünglichen Fokusebene sowie 1 und 2 μm ober- und unterhalb dieser Z-Position. Alle Bilder wurden verlustfrei im TIF-Format gespeichert und anschließend mithilfe verschiedener Bildanalysealgorithmen untersucht.

Zur Identifizierung der Zellkerne auf den DAPI-Aufnahmen wurde diese über Segmentierungs- und Schwellenwertverfahren in ein Binärbild umgewandelt und nach Wasserscheidentransformation daraus Objekte mit zuvor definierten Eigenschaften selektiert. Dabei wurden nur Objekte ausgewählt, die einen Durchmesser von 4 – 10 μm besaßen, entsprechend der Größe von unstimulierten MNZ. Darüber hinaus wurden weitere Formfaktoren berücksichtigt. Um nur kreisförmige, nicht aber elliptische Objekte in die Analyse zu integrieren, wurde das Verhältnis zwischen dem maximalen und dem minimalen Radius des Objektes für Lymphozyten empirisch auf $< 1,3$ festgelegt. Die definierte Konvexität lag im Intervall von 0,9 – 1, wobei 1 einen perfekten Kreis symbolisiert und der Wert mit zunehmenden Ausstülpungen oder Vertiefungen an der Peripherie des Objektes sinkt. Anhand dieser morphologischen Parameter konnten Lymphozyten von Monozyten, Granulozyten sowie von Zellaggregaten, stark beschädigten Zellen oder anderen Artefakten unterschieden werden.

Von den im DAPI-Bild ausgewählten Objekten erfolgte anschließend die Analyse der γH2AX -Aufnahmen. Für jede Zelle wurde die Hintergrundintensität in den einzelnen Z-Ebenen ermittelt. Anschließend erfolgte in der zusammengeführten Z-Stapelaufnahme durch Lokalisation von Helligkeitsmaxima, kombiniert mit Bereichserweiterungsalgorithmen (engl. region growing), d. h. durch Verschmelzung benachbarter, ähnlicher Pixel, die Foci-Detektion (Abb. 3.1 C).

Wurde der γH2AX -Schwellenwert in mehr als 70 % der Pixel einer aufgenommenen Zelle überschritten, entsprach dies einer pan-nukleären Färbung. Diese Zelle wurde separat erfasst, nicht aber weiter in die γH2AX -Analyse integriert. Proben, bei denen mehr als 5 % der Zellen eine pan-nukleäre Färbung aufwiesen, wurden in dieser Arbeit von der Focus-Quantifizierung ausgeschlossen.

Mithilfe der automatisierten γH2AX -Analyse konnten neben der mittleren Anzahl an γH2AX -Foci/Zelle zusätzliche Parameter, wie die mittlere integrale γH2AX -Intensität der Zelle (MFI), die mittlere Focus-Größe oder der Anteil γH2AX -positiver Zellen einer Probe, ermittelt werden. Neben der Ausgabe der tabellarischen Ergebnisdatei im CSV-Dateiformat (engl. comma-separated values), welche die berechneten Mittelwerte aus allen Zellen der jeweiligen analysierten Wells enthielt, wurden die Bilder und eine Rohdatendatei für jede Probe gespeichert. Letztere enthielt die Einzelergebnisse der jeweiligen Zellen einer Probe. Anhand dieser Angaben konnten eine Klassifizierung der Zellen bezüglich der jeweiligen Focus-Anzahl vorgenommen und die prozentuale Foci-Verteilung bestimmt werden.

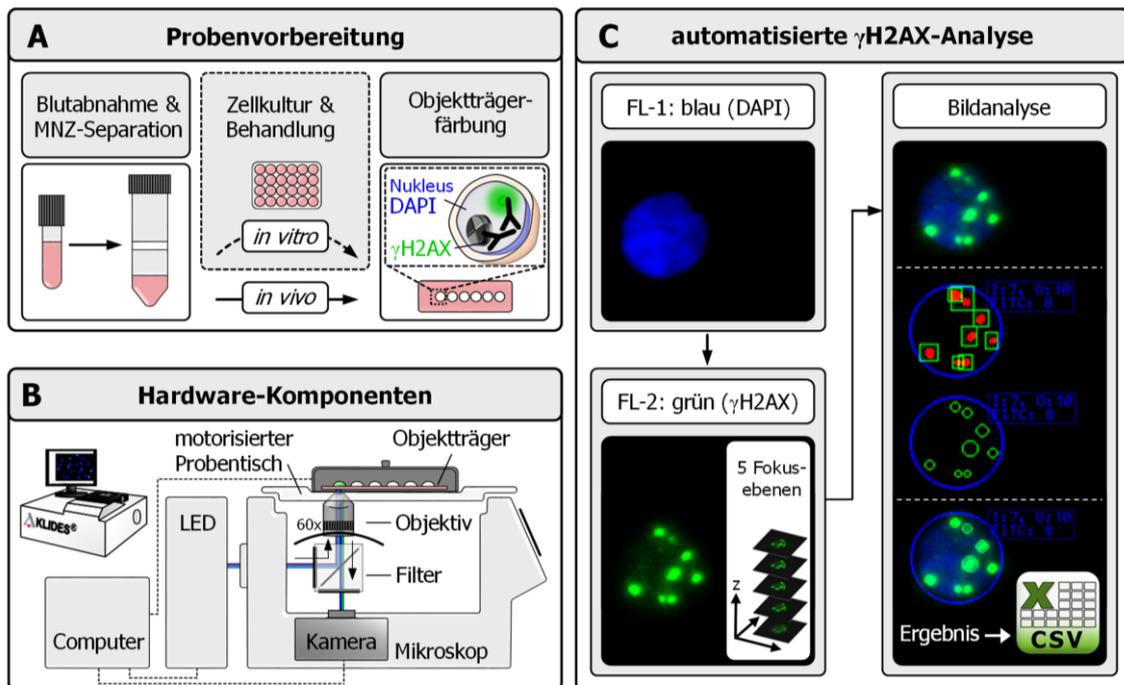


Abb. 3.1: Prinzip der automatisierten γ H2AX-Auswertung

A) Aus heparinisiertem, humanem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation die Separation der mononukleären Zellen (MNZ). Für In-vitro-Experimente wurden die MNZ vor der intranukleären γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung entsprechend der Versuchsbedingungen behandelt und die MNZ bei In-vivo-Analysen direkt nach der Separation gefärbt. Zur Detektion der Zellkerne war der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI im Eindeckmedium enthalten. **B)** Für die automatisierte γ H2AX-Analyse wurden die gefärbten Objektträger in das Aklides-System eingesetzt. Dieses basiert auf einem motorisierten inversen Epifluoreszenzmikroskop, welches mit einer CCD-Kamera und einem Computer verbunden ist. Die Plattform wird von verschiedenen Softwaremodulen gesteuert, die eine automatisierte Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Bildanalyse ermöglichen. **C)** Durch dynamische Autofokussierung wurden die DAPI-markierten Nuklei im ersten Fluoreszenzkanal (FL-1, blau) identifiziert und anhand morphologischer Merkmale selektiert. Nach Wechsel in den zweiten Fluoreszenzkanal (FL-2, grün) erfolgten die Aufnahme und Analyse der γ H2AX-Foci entlang der Z-Achse in 5-Fokusebenen. In der anschließenden Bildanalyse wurden die einzelnen Foci der Zellen mithilfe von Intensitätsmaxima und Bereichserweiterungsalgorithmen detektiert. Die erhobenen Daten (u. a. Foci/Zelle, γ H2AX-Intensität/Zelle) wurden zum einen für die einzelnen analysierten Zellen einer Probe in eine Rohdatendatei und zum anderen gemittelt über alle Zellen einer Probe als Ergebnisdatei tabellarisch im CSV-Dateiformat (engl. comma-separated values) gespeichert.

3.2.6 Durchflusszytometrische γ H2AX-Detektion

Die γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung für durchflusszytometrische Messungen wurde von je $1 \cdot 10^6$ MNZ pro Probe in Rundbodenröhrchen analog zur Objektträgerfärbung durchgeführt. In Anlehnung an das Protokoll von Redon et al. [91] erfolgte nach der 10-minütigen Fixierung der Zellen in 1-prozentigem Formaldehyd eine weitere Fixierung in 70-prozentigem Ethanol für 20 min bei Raumtemperatur bzw. bei Proben aus Kinetikversuchen, die erst am Folgetag gefärbt wurden, bei 4 °C über Nacht. Nach Abschluss der Fixierung und zweifachem Waschen in Waschpuffer (Zentrifugation: je 10 min bei 1500 rpm ($485 \times g$)) wurden die MNZ für 5 min auf Eis mit 0,1-prozentigem Triton X-100, verdünnt in Blockierungspuffer, permeabilisiert und erneut zweimal in Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte für eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur die Zugabe des 1:2000-verdünnten ($0,5 \mu\text{g/ml}$) γ H2AX-Primärantikörpers bzw. einer entsprechenden IgG-Isotypkontrolle. Nach einem zweifachen Waschschrift in Blockierungspuffer wurden der Sekundärantikörper hinzupipettiert und die Proben für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Fluoreszenzsignal zu verstärken, wurde für die Durchflusszytometrie der Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt ($4 \mu\text{g/ml}$). Nach dreifachem Waschen mit Waschpuffer wurden die Proben bis zur Messung abgedunkelt auf Eis aufbewahrt.

MNZ wurden anhand ihre Größe und Granularität mittels Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) am BD LSRFortessa cell analyzer identifiziert (Abb. 3.2). Der Median der ermittelten Fluoreszenzintensität (MFI) dieser MNZ-Population im grünen Fluoreszenzkanal wurde als Signal für die γ H2AX-Intensität gewertet und mindestens 20.000 MNZ pro Probe analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der FlowJo analyzing Software sowie mit dem quelloffenen Softwareprogramm Flowing Software. Um Schwankungen zwischen den Färbungen an verschiedenen Tagen und zwischen Zellen von unterschiedlichen Spender auszugleichen, erfolgte eine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz von den Messproben, welche für jeden Spender separat über die mitgeführte IgG-Isotypkontrolle bestimmt wurde.

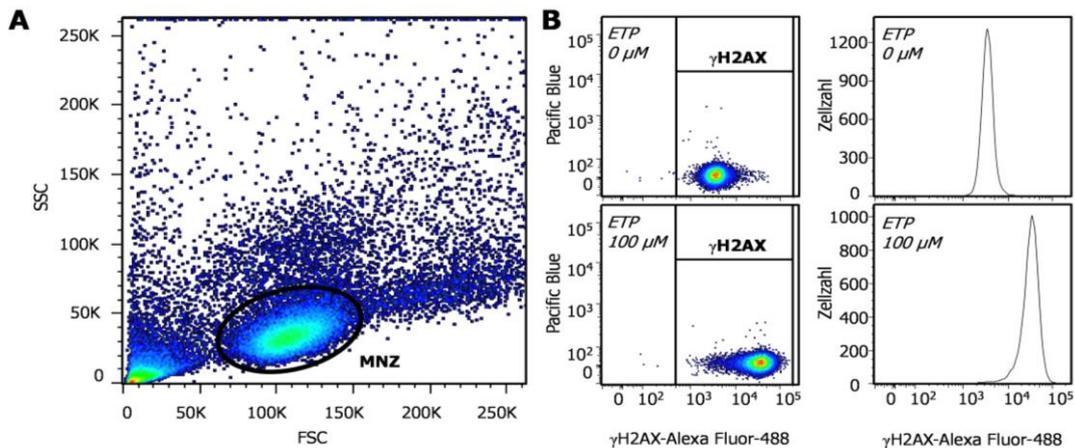


Abb. 3.2: Durchflusszytometrische Bestimmung der γ H2AX-Intensität

A) Zweidimensionale Dichteverteilung (Density-Plot) eines repräsentativen Beispiels für die Detektion der MNZ-Population anhand der FSC- und SSC-Signale. **B)** Dichteverteilung (links) und Histogramm (rechts) der selektierten MNZ-Population in Abhängigkeit von der γ H2AX-Intensität im grünen Fluoreszenzkanal. Dargestellt sind je ein repräsentatives Beispiel einer unbehandelten (oben) und einer für 1 h mit 100 μ M ETP behandelten Probe (unten).

3.2.7 SDS-PAGE und Western-Blot-basierte γ H2AX-Detektion

Die γ H2AX-Quantifizierung von Zelllysaten erfolgte per SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot in Anlehnung an das Protokoll von Redon et al. [91]. Nach der In-vitro-Behandlung wurden $1 \cdot 10^6$ MNZ in ein 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei $2000 \times g$ für 5 min und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 800 μ l eiskaltem PBS mit 10 mM NaF resuspendiert und die Probe erneut zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet direkt in 60 μ l heißem (95 °C) 1x-reduzierendem SDS-Probenpuffer lysiert und für 5 min bei 95 °C gekocht. Nach anschließendem Herunterkühlen der Proben auf Eis wurden sie bei -20 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Am Tag der Gelelektrophorese wurden die Proben erneut für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Parallel wurde ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt und der Tank mit Lauffpuffer gefüllt. In die erste Tasche des Gels wurde ein Standard aus Proteinen mit definiertem Molekulargewicht aufgetragen und die restlichen Taschen wurden mit je 20 μ l Lysat beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 150 V (konstant), bis nach ca. 1 h die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Gels nahezu erreicht hatte. Im zweiten Schritt erfolgte der Transfer der im Gel nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurde diese in doppelt destilliertem Wasser und das Gel

sowie sechs Stück Filterpapier in Transferpuffer equilibriert. Auf die Anode der Semi-dry Blotting-Apparatur wurden anschließend drei Stück Filterpapier, die Nitrozellulose Membran, das Gel und erneut drei Stück Filterpapier luftblasenfrei übereinandergelegt und das System durch Platzieren der Kathodenplatte verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 60 min bei einer Stromstärke von 0,14 A pro Gel.

Nach Ende des Transfers wurde die Membran mit der dem Gel zugewandten Seite nach oben in eine Inkubationsschale gegeben und für 30 min in Blockierungspuffer auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung des γ H2AX-Primärantikörpers (1:2000 verdünnt bzw. 0,5 μ g/ml in 3 % BSA und 0,01 % Natriumazid) erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen der Membran in Waschpuffer wurde diese mit 1:10.000 verdünntem HRP (engl. horseradish peroxidase)-gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert und erneut gewaschen. Zur Proteindetektion wurde die Membran mit lumineszierendem (engl. enhanced chemiluminescence, ECL) Western-Blot-Substrat benetzt. In der Dunkelkammer erfolgten anschließend die Belichtung sowie die Entwicklung des Lumineszenzfilms. Nach erneutem Waschen wurde analog die Färbung und Detektion von β -Aktin durchgeführt.

Zur Quantifizierung wurden die Filme eingescannt und die Intensität der Banden mittels Kodak-Image-Station bestimmt. Die jeweilige Intensität der γ H2AX-Bande wurde anhand der dazugehörigen Intensität der β -Aktin-Ladekontrolle normalisiert.

3.2.8 Zellviabilitätsbestimmung mittels Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen die Basenpaare der DNA und RNA interkaliert. Zur Optimierung des DNA-Profiles wurde Letztere durch den Zusatz von Ribonukleasen im PI/RNase-Färbepuffer verdaut. Neben Messungen des DNA-Gehalts dient diese Methode auch zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, da der Farbstoff nicht die intakte Zellmembran vitaler Zellen, jedoch die perforierte Membran toter Zellen durchdringt [87]. Für die Zellviabilitätsbestimmung wurden $0,5 \cdot 10^6$ MNZ pro Probe 10 Minuten bei $500 \times g$ in einem Rundbodenröhrchen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 μ l PI/RNase-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min, abgedunkelt bei Raumtemperatur, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen am BD FACSCalibur. Hierzu wurden die MNZ anhand der FCS- und SSC-Signale detektiert und daraus über den zweiten Fluoreszenzkanal (FL2) das Verhältnis zwischen den toten, PI-positiven (Quadrant Q1) Zellen und den lebenden, PI-negativen Zellen (Quadrant Q4) ermittelt (Abb. 3.3).

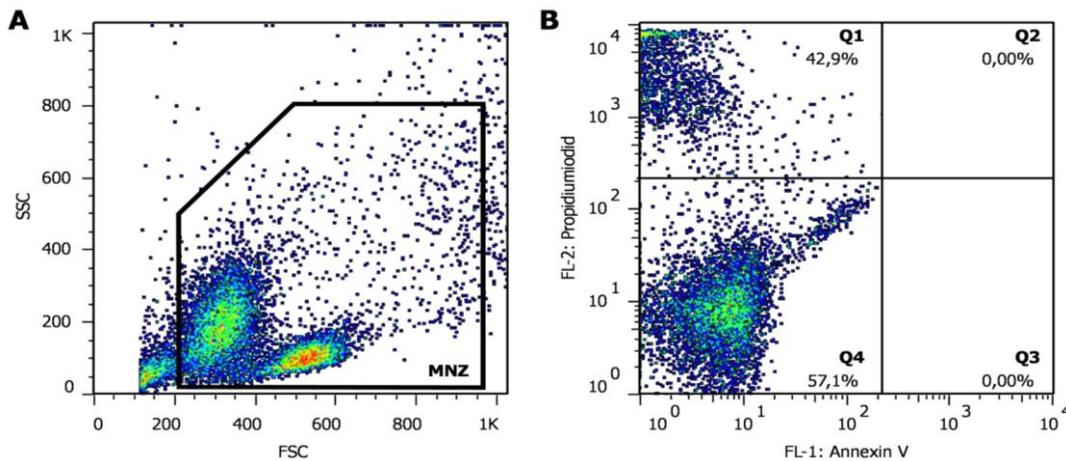


Abb. 3.3: Durchflusszytometrische Zellviabilitätsbestimmung nach PI-Färbung

A) Zweidimensionale Dichteverteilung (Density-Plot) eines repräsentativen Beispiels (10 μM ETP, 72 h) für die Detektion der MNZ-Population anhand der FSC- und SSC-Signale sowie **B)** Quantifizierung der PI-positiven Zellpopulation (tot) in Quadrant 1 (Q1) und der PI-negativen Population (lebend) in Quadrant 4 (Q4).

3.2.9 CellTiter-Blue[®] Viabilitätstest

Die Zellviabilität von unstimulierten MNZ wurde zudem mithilfe des CellTiter-Blue-Viabilitätstests entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Hierzu wurden jeweils 100 μl der behandelten Zellen mit einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml als Triplikate in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 20 μl des blauen Redoxfarbstoffes Resazurin den Proben hinzugefügt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 h das Fluoreszenzsignal des zu Resorufin reduzierten Indikators am Tecan-Reader gemessen (Absorption: 560 nm, Emission: 590 nm). Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz des Mediums wurden die Messergebnisse auf den Referenzwert der unbehandelten Zellen (100 %) normiert.

3.2.10 [³H]-Thymidin-Zellproliferationstest

Zur Untersuchung der DNA-Synthese wurden in 100 μl ($1 \cdot 10^5$ MNZ) je als Quadruplikate in 96-Loch-Platten pipettiert und anschließend für 72 h bzw. 84 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ PHA aktiviert. Danach erfolgte eine Pulsmarkierung der DNA-synthetisierenden Zellen (S-Phase) mit dem radioaktivmarkierten Nukleosid [³H]-Thymidin (dT) [147]. Hierzu wurden 20 μl [³H]-Thymidin (0,2 μCi) pro Kavität hinzupipettiert, welches während der anschließenden Inkubationszeit von 6 h bei 37 °C von Zellen kompetitiv zum zelleigenen Nukleosid in die DNA eingebaut wurde. Nach Einfrieren und Auftauen der Platten wurden die DNA-Fragmente mithilfe eines Cell-Harvesters auf eine bedruckte Glasfaserfiltermembran

überführt und getrocknet. Anschließend erfolgte in einer Mikrowelle die Beschichtung der Filtermembran mit entsprechendem Szintillatorwachs (Meltilex A für Microbeta). Nach erneutem Trocknen wurde die Membran im Wallac MicroBeta TriLux Scintillation Counter analysiert und der radioaktive Zerfall pro Minute (engl. counts per minute, cpm) als Maß für das eingebaute [³H]-Thymidin und die Zellproliferation ermittelt.

3.2.11 Mikronukleus-Test

Für die Analyse von Mikronuklei (Kapitel 4.7.3) wurden nach Abschluss der In-vitro-Exposition pro Probe $4 \cdot 10^6$ MNZ in 2 ml Medium steril in Zellkulturplatten überführt und mit 2 µg/ml PHA stimuliert. Nach 44-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte zur Zytokinese-hemmung die Zugaben von 4 µg/ml Cytochalasin B pro Probe und eine weitere Inkubation für 28 h [60]. Danach wurden die Zellen in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei $500 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min in 100 mM KCl resuspendiert, abzentrifugiert (10 min bei $100 \times g$) und vorsichtig Tropfen für Tropfen in eiskalter Fixierlösung (Methanol : Essigsäure, 1:5) aufgenommen. Das Waschen der Zellen und die erneute Zugabe von 10 ml Fixierlösung erfolgten jeweils dreimal. Nach dem letzten Waschschrift wurden die MNZ, je nach Pelletgröße, in 150 – 250 µl Fixierlösung aufgenommen und je drei Tropfen (10 µl) auf einen sauberen Glasobjektträger pipettiert. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in 5-prozentiger Giemsalösung für je 5 min gefärbt, über Nacht getrocknet, am Folgetag mit DPX-Mount und einem Deckgläschen eingedeckt und bis zum Aushärten unter der Sterilbank gelagert. Nach Fertigstellung aller Dauerpräparate wurden diese als Duplikate kodiert nach San Antonio (USA) ins Institut für Radiologie der Universität Texas geschickt, wo sie verblindet von Frau Dr. Vijayalaxmia am Lichtmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei 1000-facher Vergrößerung ausgewertet wurden. Die Quantifizierung der Mikronuklei erfolgt pro Probe in 2000 binukleären Zellen (1000 Zellen pro Duplikat). Zur Bestimmung des Verhältnisses an mono-(N1), bi-(N2) und multinukleären (N3) Zellen wurden ebenfalls 2000 Zellen pro Probe erfasst und anhand der Daten der Proliferationsindex $((1 \cdot N1 + 2 \cdot N2 + 3 \cdot N3) / 2000)$ berechnet.

3.2.12 Effluxaktivitätsanalyse des ABC-Transporters P-Glykoprotein

Zur intrazellulären Aufnahme des fluoreszierenden P-Glykoproteinsubstrats Rhodamin-123 wurde dieses in einer Endkonzentration von 500 ng/ml der Zellsuspension zugefügt ($14 \cdot 10^6$ MNZ in 14 ml pro Probe). Nach einer Inkubationszeit von 1 h abgedunkelt bei 37 °C wurde das extrazelluläre Rhodamin durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und $500 \times g$ entfernt und das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden $1 \cdot 10^6$ MNZ zur Bestimmung des Initialwerts (t_0) sofort entnommen und die restlichen Zellen in drei Gruppen zu je $4 \cdot 10^6$ MNZ aufgeteilt. Eine der Proben blieb unbehandelt, wohingegen

zu den anderen beiden Proben entweder 10 μM Cyclosporin A bzw. 10 μM Rapamycin hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30, 60 und 120 min wurden je $1 \cdot 10^6$ MNZ pro Probe entnommen. Nach der jeweiligen Entnahme erfolgten zwei Waschschrte bei 4 °C mit eiskaltem PBS mit 0,5 % BSA und die Aufbewahrung der Proben abgedunkelt auf Eis. Am Ende des Experiments wurde die 10 Proben durchflusszytometrisch, analog zur γH2AX -Detektion, analysiert und die intrazelluläre Rhodamin-123-Konzentration der MNZ-Population über ihre Intensität im grünen Fluoreszenzkanal ermittelt. Die Rhodamin-123-MFI wurden anschließend auf den Ausgangswert ($t_0 = 100\%$) normiert.

3.2.13 Statistische Analysen

Die erhobenen Messdaten wurden mit MS Excel ausgewertet sowie mit Graph Pad Prism graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Zur Signifikanzüberprüfung wurde je nach Experiment der dafür geeignete statistische Test verwendet. Bei Analysen zwischen zwei Gruppen wurde der Mittelwertunterschied mithilfe des t-Tests untersucht. Beim Mittelwertvergleich von mehr als zwei Teilgruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. one-way ANOVA (analysis of variance)) als statistisches Verfahren genutzt. Bei den durchgeführten Experimenten handelte es sich meist nicht um unabhängige Teilgruppen, da die Zellen eines Spenders unterschiedlichen Behandlungen unterzogen bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert worden sind. Daher erfolgte eine angepasste Varianzanalyse für Messwertwiederholungen (engl. repeated measures ANOVA). Das festgelegte Konfidenzintervall lag bei 95 % ($\alpha = 0,05$). Darüber hinaus erfolgte anschließend die Durchführung eines Post-hoc-Tests nach Dunnett, um zu ermitteln, ob die verschiedenen Behandlungsbedingungen signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hervorriefen. Im Text sowie in den Abbildungen sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM) angegeben. Signifikanzen sind in den Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: $P \leq 0,001$: ***, $P \leq 0,01$: **, $P \leq 0,05$: *, $P > 0,05$: n.s. (nicht signifikant).

3.3 Ethikvoten und Probanden

3.3.1 Ethikvotum

Bei den durchgeführten Studien handelte es sich entweder um In-vitro-Experimente oder um nicht-interventionelle In-vivo-Studien. Alle Probanden erhielten vor der Blutentnahme eine schriftliche Probandeninformation und gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Teilnahme. Die Studien wurden durch die Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt (RAD244 DSB-MRT; RAD265 DSB-7-Tesla-MRT-Probanden).

3.3.2 Probanden

In-Vitro-Analysen

Für die reinen In-vitro-Analysen wurden MNZ von gesunden Blutspendern, sowohl Männern als auch Frauen, im Alter von 18 – 60 Jahren verwendet.

In-vivo-Studie zur γ H2AX-Foci-Induktion nach MRT und CT

In diese prospektive Diagnostikstudie (Kapitel 4.7.2) wurden 53 Patienten aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Universitätsklinik Magdeburg A. ö. R. im Alter von 18 – 80 Jahren eingeschlossen, bei denen zuvor keine Leukämie oder Lymphome diagnostiziert worden waren, die keiner Radio- oder Chemotherapie unterzogen waren und die innerhalb der letzten drei Tage weder eine Röntgenaufnahme noch Szintigraphie erhielten.

Studie zur Untersuchung der DNA-Integrität in MNZ von Probanden mit erhöhter 7 T-MRT-Exposition

Für diese Studie (Kapitel 4.7.3) wurden 11 gesunde Männer im Alter zwischen 29 – 49 Jahren, die als Probanden oder aus beruflichen Gründen häufig gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern exponiert waren (EXP), untersucht. Als Kontrollgruppe (KG) dienten 11 gesunde Männer im Alter zwischen 24 – 54, die 1 Jahr vor Studienbeginn keiner MRT-Exposition ausgesetzt waren. Raucher, sowie Personen, bei denen zuvor eine Leukämie oder ein Lymphom diagnostiziert worden waren, die einer Radio- oder Chemotherapie unterzogen wurden oder innerhalb der letzten drei Tage vor Studienbeginn eine Röntgenaufnahme bzw. Szintigraphie erhielten, wurden nicht in die Untersuchung integriert.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der automatisierten γ H2AX-Focus-Analyse an MNZ von gesunden Blutspendern

4.1.1 Vergleich zwischen manueller und automatisierter Auswertung des γ H2AX-Immunfluoreszenztests

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Validierung durchgeführt, bei der die Daten aus der automatisierten Focus-Analyse des AKLIDES-Systems der Medipan GmbH mit Ergebnissen nach manueller γ H2AX-Foci-Quantifizierung verglichen wurden. Bei der automatisierten Analyse wurden die Belichtungszeiten für den blauen und grünen Fluoreszenzkanal zuvor definiert und waren für jede Messung identisch. Aufnahmen desselben Bildausschnitts, zum einen erstellt am AKLIDES und zum anderen manuell am Mikroskop aufgenommen, zeigten sehr gute Übereinstimmungen. Eine repräsentative Beispielaufnahme ist in Abb. 4.1 A dargestellt. Hierbei handelte es sich jeweils um die überlagerte Darstellung (Z-Projektion) aus 5 Fokusebenen des γ H2AX-Kanals mit einem Abstand (ΔZ) von je $1\ \mu\text{m}$. Zur besseren Visualisierung in gedruckter Form wurden die Bilder in Abb. 4.1 B im Vergleich zu Abb. 4.1 A als invertiertes Graustufenbild dargestellt.

Abb. 4.1 C zeigt die Verteilung der γ H2AX-Foci entlang der Z-Achse von einer mit $10\ \mu\text{M}$ Etoposid (ETP) behandelten Zelle. Die mittlere Fokusebene der Zelle entspricht der Z-Ebene 0 (Z_0). Je nach Anzahl der weiteren Z-Ebenen und deren Abstand erfolgte die Aufnahme zusätzlicher Bilder, die mit in die Focus-Analyse integriert worden sind. Um den Einfluss der Anzahl an Z-Ebenen auf die Menge detektierter γ H2AX-Foci zu untersuchen, wurden in drei unabhängigen Experimenten Zellen für 16 Stunden mit $10\ \mu\text{M}$ ETP bzw. ohne ETP behandelt.

Von jeder Probe wurden 200 Zellen analysiert und ursprünglich Aufnahmen von 17 Z-Ebenen ($Z_0 \pm 4\ \mu\text{m}$) in einem Abstand von je $0,5\ \mu\text{m}$ (ΔZ) generiert. Anschließend erfolgte mithilfe der AKLIDES-Software eine erneute Analyse, in die eine verringerte Anzahl an Bildern (Z-Ebenen) einbezogen wurde. Bei der Auswertung von 9 Ebenen wurde der Abstand (ΔZ) von $0,5$ auf $1\ \mu\text{m}$ verdoppelt und nur jedes zweite Bild in die Analyse integriert. In den anschließenden Durchläufen blieb ΔZ konstant bei $1\ \mu\text{m}$. Durch Ausschluss der

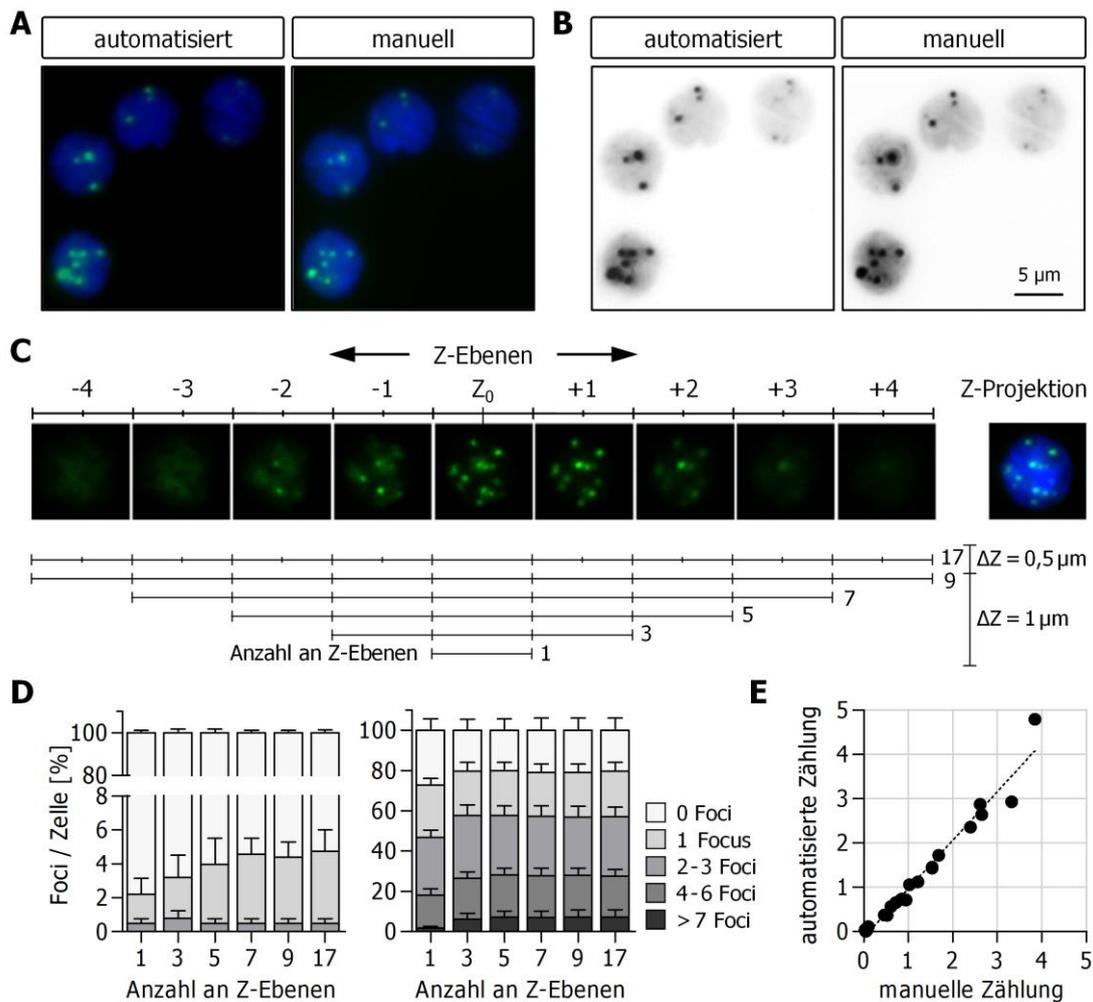


Abb. 4.1: Vergleich zwischen manueller und automatisierter γ H2AX-Focus-Analyse und Einfluss der Z-Ebenenanzahl auf die automatisch quantifizierten γ H2AX-Foci

A) Überlagerte Aufnahme (Z-Projektion) aus 5 Fokusebenen desselben Bildausschnitts, aufgenommen im Abstand von je 1 μ m. Links: Aufnahme generiert während der automatisierten Messung (60x-Objektiv, Luft). Rechts: Aufnahme manuell erstellt am Fluoreszenzmikroskop (63x-Objektiv, Öl). Die DAPI-gefärbten Zellkerne sind blau, die γ H2AX-Foci grün dargestellt. **B)** Invertiertes Graustufenbild der Aufnahmen aus (A) zur besseren Visualisierung in gedruckter Form. **C)** Ein Beispiel zur Veranschaulichung der γ H2AX-Foci-Verteilung entlang der Z-Achse einer für 16 h mit 10 μ M ETP behandelten Zelle. Die mittlere Fokusebene entspricht der Z-Ebene 0 (Z_0). Aufnahmen zusätzlicher Z-Ebenen im Abstand von ΔZ wurden während der automatisierten Messung gleichmäßig ober- und unterhalb von Z_0 generiert. Die Linien unterhalb der Bilder veranschaulichen, welche Aufnahmen in die γ H2AX-Analysen bei Verwendung verschiedener Z-Ebenenanzahlen einbezogen worden sind. **D)** Einfluss der Z-Ebenenanzahl auf den Wert detektierter Foci/Zelle [%] für unbehandelte Zellen (links) und behandelte Zellen (rechts, 10 μ M ETP). **E)** Proben wurden für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an ETP (0–10 μ M) behandelt und die generierten Bilder anschließend sowohl manuell, als auch automatisch ausgezählt. Jeder Punkt repräsentiert die quantifizierten γ H2AX-Foci einer Probe (n = 20).

jeweils äußeren Z-Aufnahmen ober- und unterhalb der mittleren Fokusebene wurde die Anzahl auf 7 ($Z_0 \pm 3 \mu\text{m}$), 5 ($Z_0 \pm 2 \mu\text{m}$), 3 ($Z_0 \pm 1 \mu\text{m}$) und 1 Ebene (Z_0) reduziert. Der Ablauf hierzu ist in der Legende zu Abb. 4.1 C dargestellt. Wie in Abb. 4.1 D zu sehen, gab es in der Anzahl detektierter Foci Unterschiede zwischen Analysen, in denen die mittlere Fokusebene (Z_0) allein, und Analysen, in denen mehrere Fokusebenen quantifiziert wurden. Eine Erweiterung der Fokusebenen auf mehr als 5 Ebenen führte weder bei unbehandelten noch bei ETP-behandelten Zellen zu Änderungen der detektierten γH2AX -Foci, verursachte jedoch aufgrund der zusätzlichen Aufnahmen eine Zunahme der Messzeit und des Datenvolumens. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde die Anzahl der analysierten Z-Ebenen anfangs auf 3 und bei Versuchen in Kapitel (4.2, 4.5 – 7) auf 5 Z-Ebenen mit einem Abstand (ΔZ) von je $1 \mu\text{m}$ festgelegt.

Aufbauend auf den hier erhobenen Daten von γH2AX -Analysen ETP-behandelter MNZ erfolgte von der Medipan GmbH die Anpassung weiterer Parameter für die automatisierte γH2AX -Quantifizierung. Diesbezüglich wurden u. a. der Intensitätsschwellenwert, der minimale sowie maximale Focus-Durchmesser oder Grenzwerte für die Focus-Konvexität definiert. Zur Evaluierung der Software wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit automatisiert erhobene Daten mit manuell ausgezählten γH2AX -Foci derselben Proben verglichen. Die Resultate aus vier unabhängigen Experimenten mit je 5 ETP-Konzentrationen ($0 - 10 \mu\text{M}$) zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen der manuell und der automatisiert bestimmten Anzahl an γH2AX -Foci (Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0,9827$; $P < 0,0001$) (Abb. 4.1 E). Ein Vergleich von Proben nach Behandlung mit höheren ETP-Konzentrationen war jedoch nicht möglich, da ab Konzentrationen von $20 \mu\text{M}$ ETP die γH2AX -Foci überlagert waren und die einzelnen Foci manuell nicht mehr zuverlässig erfasst werden konnten.

4.1.2 Charakterisierung der automatisierten γH2AX -Analyse nach dosisabhängiger Induktion von DNA-DSB durch Etoposid

Zur Evaluierung einer dosisabhängigen Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden isolierte MNZ über Nacht mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zytostatikums Etoposid behandelt. Hierbei wurde eine 1:2-serielle Verdünnung von $1,25 - 20 \mu\text{M}$ angewendet. Nach anschließender γH2AX -Färbung erfolgte die Bestimmung verschiedener Parameter durch die automatisierte Objektträgerauswertung. Beispielaufnahmen der Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden ETP-Konzentrationen sind in Abb. 4.2 A abgebildet. Die Anzahl an γH2AX -Foci und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen einer Probe sind als Punktwolkendiagramme für einen repräsentativen Versuch in Abb. 4.2 B dargestellt. Mit

zunehmender ETP-Konzentration ist eine deutliche Verschiebung der Punktwolke entlang beider Achsen zu erkennen. Diese γ H2AX-Erhöhung wird ebenfalls in der Darstellung der gemittelten Werte aus 9 Experimenten deutlich (Abb. 4.2 C, D). Die Anzahl an γ H2AX-Foci und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen nahmen von ursprünglich $0,06 \pm 0,02$ Foci/Zelle bzw. $19,7 \pm 4,2$ MFI mit steigender ETP-Konzentration zu. Während die Dosis-Wirkungskurve für die γ H2AX-Intensitätsmessung auch bei hohen ETP-Konzentrationen linear verlief, konnte bei der Quantifizierung der einzelnen γ H2AX-Foci mit steigender ETP-Dosis ein Abflachen der Kurve beobachtet werden (Abb. 4.2 C, ohne Clusteranalyse).

Um einer Unterbewertung überlappender γ H2AX-Foci entgegenzuwirken, wurden Foci, die einen empirisch bestimmten Durchmesser von $1,2 \mu\text{m}$ überschritten, als sogenannte Cluster klassifiziert. Die Anzahl dieser Cluster erhöhte sich ebenfalls mit zunehmender ETP-Konzentration und stieg von $0,001 \pm 0,001$ Cluster/Zelle bei unbehandelten Proben auf $1,04 \pm 0,13$ Cluster/Zelle nach 16-stündiger Inkubation mit $20 \mu\text{M}$ ETP an (Abb. 4.2 E). Mithilfe einer differenzierten Clusteranalyse, bei der ein einzelner Cluster nicht als Einzelfocus gewertet wurde, sondern anhand der Größe eine Berechnung der integrierten Foci erfolgte, konnte eine Optimierung der Focus-Quantifizierung erzielt werden (Abb. 4.2 C, mit Clusteranalyse). Während die Anwendung der zusätzlichen Clusteranalyse bei Proben mit geringen ETP-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte, zeigte sich bei Proben, die zuvor mit $20 \mu\text{M}$ ETP inkubiert wurden, ein signifikanter Anstieg der quantifizierten Foci von zuvor $3,87 \pm 0,10$ Foci/Zelle auf $7,44 \pm 0,49$ Foci/Zelle (gepaarter t-Test, $P < 0,0001$). Dadurch konnte die Linearität der Dosis-Wirkungsbeziehung, gemessen am Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, von $R^2 = 0,964$ ohne Clusteranalyse auf $R^2 = 0,997$ mit Clusteranalyse verbessert werden.

Die basale Rate an γ H2AX-positiven MNZ variierte zwischen den einzelnen Blutspendern und betrug im Durchschnitt $4,3 \pm 1,2$ %. Nach ETP-Behandlung konnte bei allen Proben eine dosisabhängige Zunahme γ H2AX-positiver Zellen beobachtet werden. Eine detailliertere Übersicht über die prozentuale Foci-Verteilung innerhalb der Zellen in Abhängigkeit von der ETP-Konzentration ist in Abb. 4.2 F gezeigt. Bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ wiesen nahezu alle Zellen ($96,1 \pm 1,0$ %) γ H2AX-Foci auf.

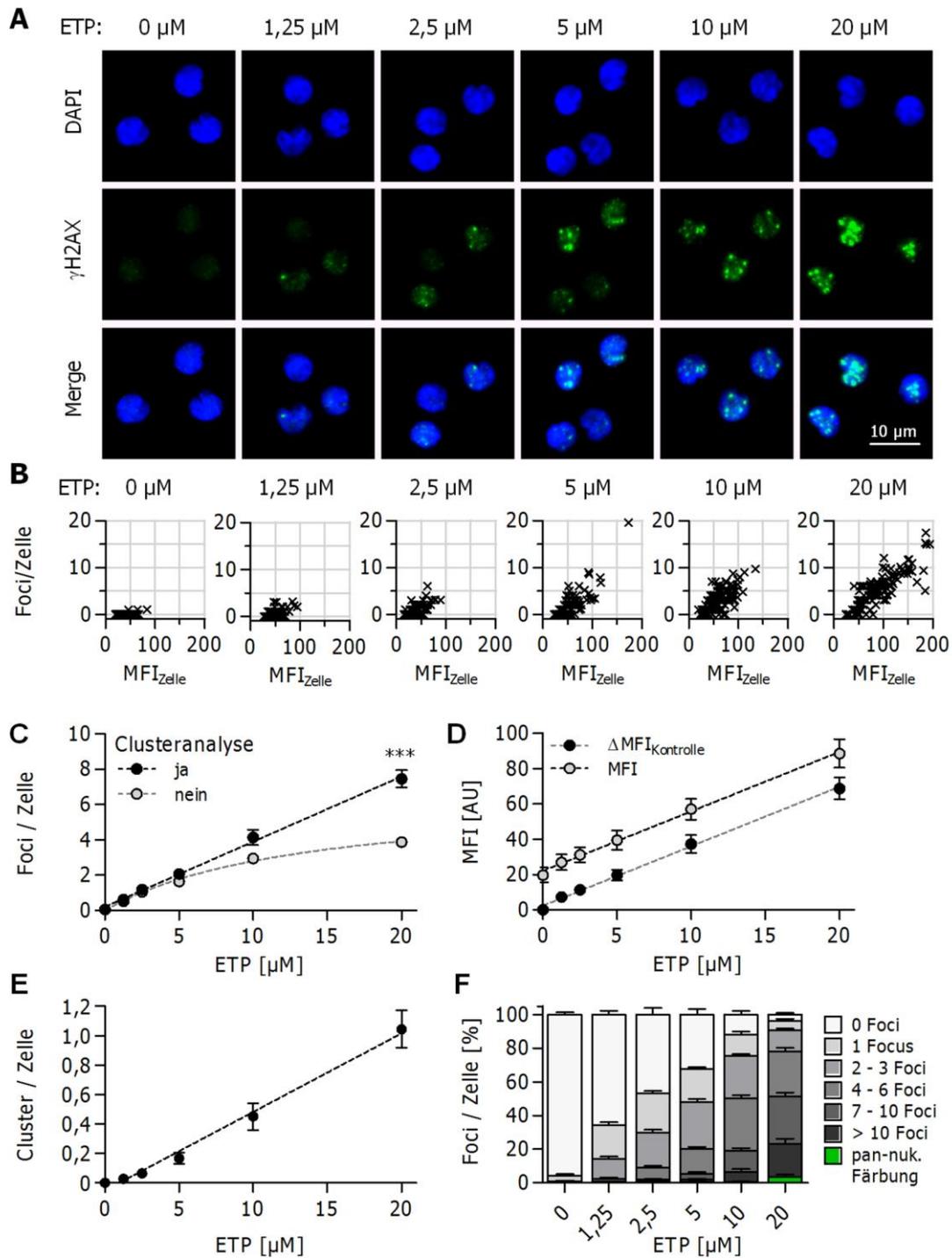


Abb. 4.2: Automatisierte γH2AX -Analyse nach dosisabhängiger Induktion von DNA-DSB in MNZ durch ETP-Behandlung über 16 h

A) Automatisiert aufgenommene Mikroskopiebilder von DAPI-gefärbten Zellkernen (blau) und γH2AX -Foci (grün) nach 16-stündiger Inkubation mit der jeweils angegebenen Konzentration an ETP. **B)** Punktwolkendiagramm eines repräsentativen Beispiels zeigt die Anzahl an γH2AX -Foci sowie die γH2AX -Intensität der einzelnen Zellen (\times) einer Probe für die angegebenen ETP-Konzentrationen. **C)** Die Diagramme zeigen den Mittelwert an γH2AX -Foci/Zelle bestimmt mit und ohne zusätzliche Clusteranalyse, **D)** die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ohne und mit (ΔMFI) Subtraktion der Hindergrundfluoreszenz, **E)** die mittlere Anzahl an Clustern/Zelle sowie **F)** die mittlere prozentuale Focus-Verteilung aus 9 Versuchen in Abhängigkeit von der ETP-Konzentration, dargestellt als MW \pm SEM.

4.1.3 Einfluss der analysierten Zellzahl auf die Messgenauigkeit

Um den Einfluss der Zellzahl auf die Präzision der γ H2AX-Quantifizierung zu ermitteln, wurden MNZ für 1 h mit 0 μ M, 1 μ M oder 10 μ M ETP inkubiert und für alle drei Bedingungen je eine 12-fach-Bestimmung durchgeführt. Pro Bedingung wurden von jeder der 12 Auftragsstellen ursprünglich mindestens 1000 Zellen analysiert und anschließend die ersten 25, 50, 100, 200, 500 bzw. 1000 Zellen in die Berechnung des γ H2AX-Mittelwertes einbezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3 dargestellt. Die Präzision wurde über den Variationskoeffizienten (VK) kalkuliert. Dieser beschreibt die relative Streuung (Standardabweichung, STD) um den Mittelwert (MW), ($VK = STD \times 100/MW$). Die einzelnen Daten sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Für alle drei Bedingungen zeigte sich eine Verringerung der Streuung bzw. des Variationskoeffizienten mit zunehmender Anzahl analysierter Zellen. Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass die Messgenauigkeit nicht nur von der Anzahl der erfassten Zellen, sondern auch von der Gesamtzahl detektierter Foci abhängig ist. Dies spiegelt sich in den differierenden Variationskoeffizienten bei gleicher Zellzahl aber unterschiedlicher ETP-Konzentration wider. Bei Proben, die mit 10 μ M ETP behandelt wurden, lag der VK bereits nach Quantifizierung von 50 Zellen unterhalb von 10 %, hier flossen im Mittel 162 Foci pro Well in die Berechnung des Mittelwertes ein. Im Vergleich dazu lag der VK nach Auswertung von 50 unbehandelten Zellen und einem Mittelwert von 7 Foci pro Auftragsfläche bei 37 %.

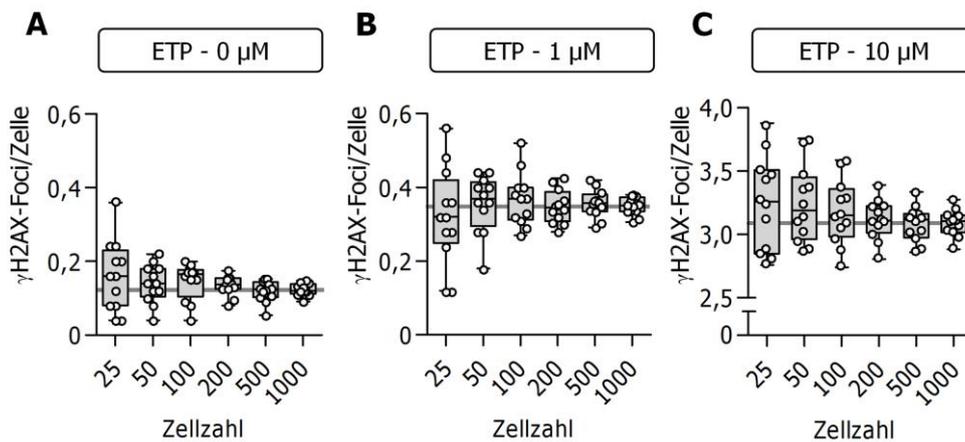


Abb. 4.3: Einfluss der Anzahl an analysierten Zellen auf die Messgenauigkeit

In einer 12-fach-Bestimmung wurden Zellen für 1 h entweder mit 0 μ M, 1 μ M oder 10 μ M ETP behandelt und nach γ H2AX-Färbung jeweils 1000 Zellen pro Auftragsstelle analysiert. Anschließend wurden in die Auswertung entweder die ersten 25, 50, 100, 200, 500 oder 1000 analysierten Zellen der einzelnen Auftragsstellen einbezogen (\circ). Die Kastengrafik (engl. Box-Whisker-Plot) veranschaulicht die Streuung der 12-fach-Bestimmung. Der Kasten symbolisiert den Bereich des oberen und unteren Quartils, getrennt durch den Median (–). Die Antennen umfassen den restlichen Bereich zwischen Minimum und Maximum der Daten. Die graue horizontale Linie im Hintergrund zeigt für die jeweilige ETP-Konzentration den Mittelwert aller 12.000 erfassten Zellen.

Tabelle 4.1: Einfluss der Anzahl an analysierten Zellen auf die Messgenauigkeit

In einer 12-fach-Bestimmung wurden Zellen entweder mit 0, 1, oder 10 μM ETP für 1 h behandelt und nach γH2AX -Färbung jeweils 1000 Zellen pro Auftragsfläche (Well) analysiert. Anschließend wurden für die Auswertung entweder die ersten 25, 50, 100, 200, 500 oder 1000 Zellen der jeweiligen Wells herangezogen. Die folgende Tabelle zeigt für die jeweilige 12-fach-Bestimmung die durchschnittliche Anzahl an Foci, die pro Well in die Berechnung eingingen, den Mittelwert (MW) an Foci/Zelle sowie die berechnete Standardabweichung (STD) und den ermittelten Variationskoeffizienten (VK).

Zellen/Well	25	50	100	200	500	1000
0 μM ETP						
MW Foci/Well	4	7	15	27	60	123
MW Foci/Zelle	0,16	0,14	0,15	0,14	0,12	0,12
STD Foci/Zelle	0,10	0,05	0,05	0,03	0,03	0,02
VK	59,4 %	37,1 %	33,8 %	19,9 %	23,8 %	13,2 %
1 μM ETP						
MW Foci/Well	8	18	37	70	178	349
MW Foci/Zelle	0,32	0,36	0,37	0,35	0,36	0,35
STD Foci/Zelle	0,13	0,08	0,07	0,05	0,04	0,02
VK	40,7 %	21,6 %	19,5 %	13,0 %	10,6 %	6,9 %
10 μM ETP						
MW Foci/Well	81	162	318	623	1541	3089
MW Foci/Zelle	3,25	3,24	3,18	3,12	3,08	3,09
STD Foci/Zelle	0,38	0,31	0,26	0,16	0,14	0,11
VK	11,5 %	9,5 %	8,2 %	5,1 %	4,6 %	3,4 %

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde, im Vergleich zu den Versuchen in Kapitel 4.1 – 5, die Anzahl ausgewerteter Zellen von 100 auf 200 Zellen pro Well verdoppelt (Daten in Kapitel 4.6 – 7). In der durchgeführten Untersuchung lag der ermittelte Variationskoeffizient nach Auswertung von 200 unbehandelten Zellen bei 19,9 % ($\pm 0,03$ Foci). Nach Behandlung der Zellen mit 10 μM ETP sank der VK auf 5,1 % ($\pm 0,16$ Foci) und lag damit unterhalb von 10 %. In der genutzten Softwareversion konnte keine separate Minimalzahl an zu detektierenden Foci angegeben werden, sondern nur eine minimale Zellzahl, die für alle Wells identisch war. Da eine Vervielfachung der Zellzahl bei mehr als 200 Zellen nur noch eine geringfügige Verbesserung des VK hervorrief, jedoch eine Vervielfachung der Analysezeit und des generierten Datenvolumens verursachte, wurde bisher von der Auswertung von mehr als 200 Zellen pro Well abgesehen.

Die Validierung bestätigte eine gute Korrelation zwischen manueller und automatisierter Focus-Quantifizierung und die Präzision des Verfahrens und damit dessen Eignung für die automatisierte γH2AX -Analyse.

4.2 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur γ H2AX-Detektion und Zytotoxizitätsbestimmung

4.2.1 Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Etoposid und γ H2AX in MNZ analysiert mittels automatisierter Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Western-Blot-Verfahren

Die Konzentration phosphorylierter H2AX-Moleküle in einer Probe kann mithilfe spezifischer Antikörper gegen γ H2AX über unterschiedliche indirekte Nachweismethoden analysiert werden. In den folgenden Untersuchungen wurde die Detektion von γ H2AX durch automatisierte Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie sowie durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot verglichen. Um ein großes Spektrum an induzierten DNA-DSB abzudecken, wurden MNZ mit unterschiedlichen Konzentrationen an ETP (0,05 bis 250 μ M) für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse des γ H2AX-Niveaus der Proben anhand der drei genannten Methoden in jeweils fünf unabhängigen Experimenten.

Bei der Auswertung mittels automatisierter Mikroskopie am AKLIDES-System wurden zum einen die mittlere Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle und zum anderen die mittlere Fluoreszenzintensität der MNZ in die Vergleichsanalyse integriert. Repräsentative Mikroskopaufnahmen sind in Abb. 4.4 A dargestellt. Wie bereits aus diesen Aufnahmen zu erkennen ist, wiesen ab einer ETP-Konzentration von 50 μ M mehr als 10 % der Zellen eine pan-nukleäre Färbung auf. Diese Proben überschritten den intern festgelegten maximalen Grenzwert von 5 % pan-gefärbter Nuklei und wurden von der Focus-Quantifizierung ausgeschlossen (Abb. 4.4 B, gekennzeichnet mit #). Die Dosis-Wirkungskurven beider Parameter sind in Abb. 4.4 B bzw. Abb. 4.4 C gezeigt.

Die durchflusszytometrisch erfassten γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind für einen repräsentativen Versuch in Form von Histogrammen in Abb. 4.5 A dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle konnte in den Histogrammen bei Konzentrationen ab 10 μ M eine deutliche Intensitätssteigerung und Verschiebung der Kurve beobachtet werden. Die Dosis-Wirkungskurve der MFI aus 5 Versuchen ist in Abb. 4.5 B abgebildet.

Für die γ H2AX-Analyse mittels Western-Blot wurden für die SDS-PAGE die Taschen des Gels mit Zellysats beladen, nach der Gelelektrophorese die Proben auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet und diese sequentiell mittels γ H2AX- und β -Aktin-Antikörpern gefärbt. Nach Entwicklung der Filme (Abb. 4.5 C) wurden die jeweiligen Intensitäten der γ H2AX- und β -Aktin-Banden mithilfe der Kodak-Image-Station ermittelt und die γ H2AX-Werte entsprechend der dazugehörigen β -Aktin-Konzentration normalisiert.

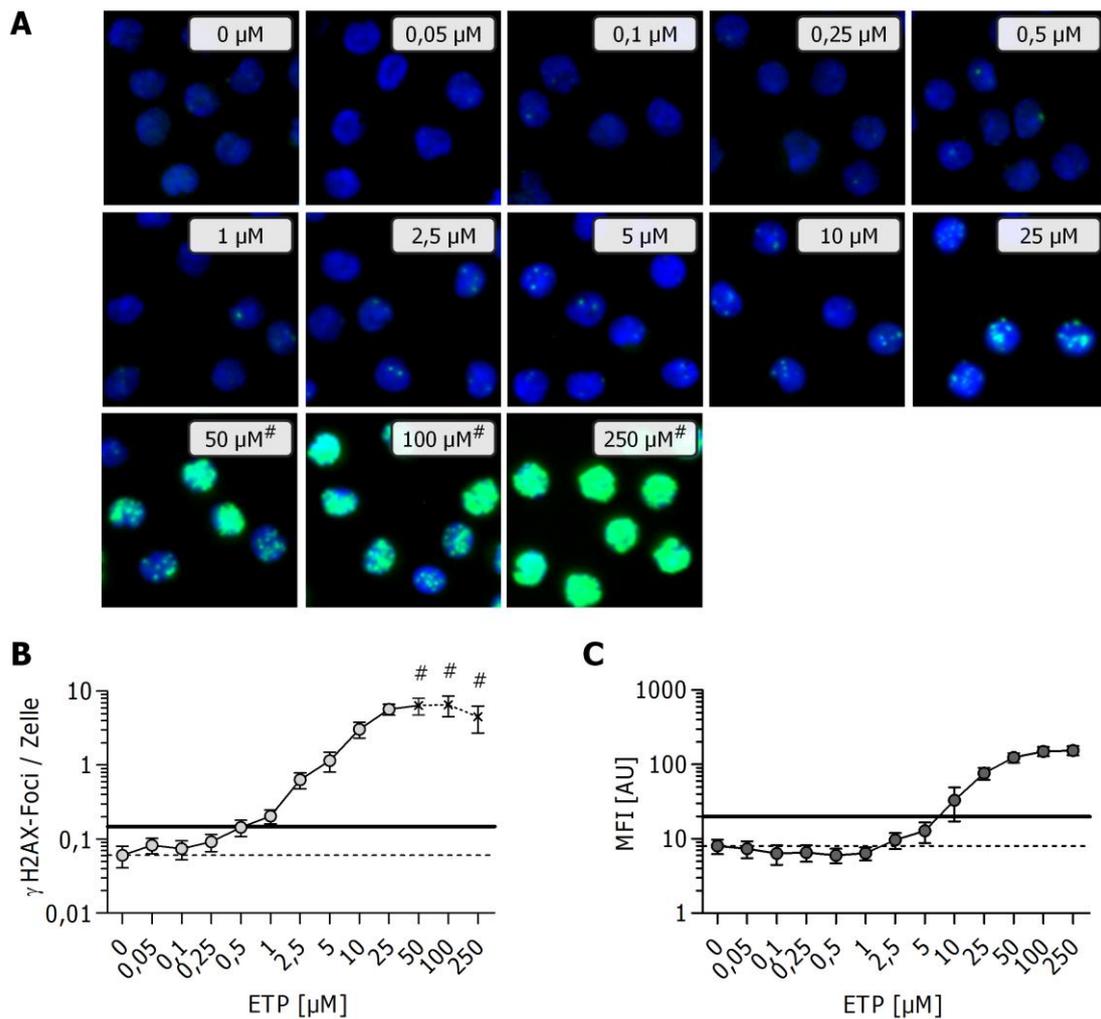


Abb. 4.4: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der ETP-Konzentration und den γH2AX -Foci bzw. der γH2AX -Intensität pro Zelle analysiert mittels automatisierter Mikroskopie

A) Mikroskopaufnahmen von DAPI- (blau) und γH2AX -gefärbten (grün) MNZ gesunder Blutspender 1 h nach In-vitro-Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an ETP. **B)** MW \pm SEM an γH2AX -Foci/Zelle und **C)** mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 5 unabhängigen Versuchen in Relation zur ETP-Dosis. Proben, bei denen mehr als 5 % der Zellen eine pan-nukleäre Färbung aufwiesen, lagen oberhalb der Quantifizierungsgrenze für die Erfassung der einzelnen γH2AX -Foci und sind mit # markiert. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die jeweiligen Mittelwerte der unbehandelten Kontrollproben. Aus der Summe dieses Mittelwerts und dessen dreifacher Standardabweichung wurde die Nachweisgrenze berechnet, dargestellt als dicke Linie.

Zellen, die mit einer ETP-Konzentration $\geq 100 \mu\text{M}$ behandelt wurden, wiesen im Western-Blot bei der herkömmlichen Chemilumineszenzanalyse Banden auf, die außerhalb des linearen Bereichs lagen und daher aus der Quantifizierung ausgeschlossen werden mussten (Abb. 4.5 D, gekennzeichnet mit #). Die gesamte Dosis-Wirkungskurve aus den gemittelten Werten 5 unabhängiger Versuche ist in Abb. 4.5 D dargestellt.

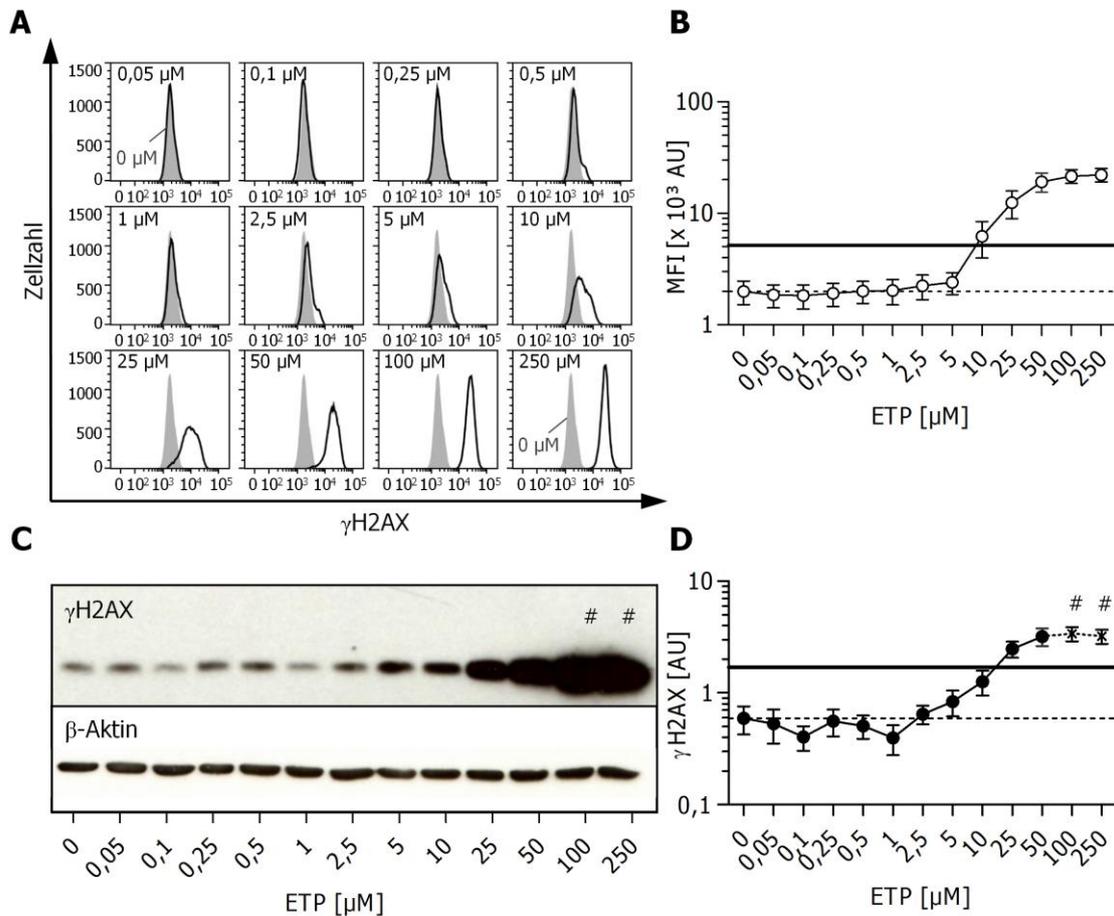


Abb. 4.5: Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der ETP-Konzentration und dem γ H2AX-Niveau mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot

Nachweis von γ H2AX in MNZ gesunder Spender nach einstündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an ETP. **A)** Darstellung der am Durchflusszytometer gemessenen γ H2AX-Fluoreszenzintensitäten eines repräsentativen Versuches in Form von Histogrammen sowie **B)** die gemittelten Werte (MW \pm SEM) aus 5 Versuchen. **C)** Repräsentativer Western-Blot von Zelllysaten nach γ H2AX- und β -Aktin-Färbung. **D)** Darstellung der quantifizierten Bandenintensitäten von 5 Versuchen (MW \pm SEM), normalisiert auf den dazugehörigen β -Aktin-Wert. Die mit # markierten Proben lagen oberhalb der Quantifizierungsgrenze. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die jeweiligen Mittelwerte der unbehandelten Kontrollproben. Aus der Summe dieses Mittelwerts und dessen dreifacher Standardabweichung wurde die Nachweisgrenze berechnet, dargestellt als dicke horizontale Linie.

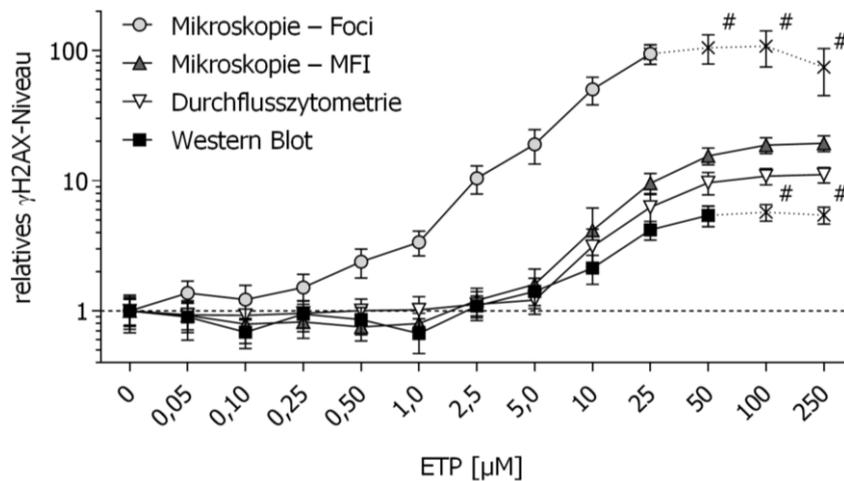


Abb. 4.6: Vergleich der γH2AX -Analyse mittels Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Western-Blot

Darstellung der relativen γH2AX -Werte ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) aus den Diagrammen 4.4 B und C sowie 4.5 B und D nach Normierung der Daten bezüglich der jeweiligen unbehandelten Kontrolle ($0 \mu\text{M}$ ETP = 1), gekennzeichnet als gestrichelte Linie. Werte der mit # markierten Proben lagen oberhalb der Quantifizierungsgrenze.

Zum besseren Vergleich der Methoden wurden die jeweiligen Nachweisgrenzen (NG) bestimmt. Diese entsprachen der Summe des Mittelwerts der Negativkontrolle (NK, ETP $0 \mu\text{M}$) und dessen dreifacher Standardabweichung ($\text{NG} = \text{MW}_{\text{NK}} + 3 \text{STD}_{\text{NK}}$) [148]. Durch Interpolation wurde die entsprechende ETP-Konzentration zur jeweiligen Nachweisgrenze berechnet. Während bei der γH2AX -Focus-Quantifizierung die Nachweisgrenze bereits ab einer Konzentration von $0,53 \mu\text{M}$ ETP erreicht wurde, konnte diese erst ab einer Konzentration von $6,7 \mu\text{M}$ ETP bei der Intensitätsmessung mittels automatisierter Mikroskopie bzw. ab einer Dosis von $8,7 \mu\text{M}$ ETP in der Durchflusszytometrie überschritten werden. Die geringste Sensitivität zeigte die γH2AX -Analyse mittels Western-Blot-Verfahren. Aufgrund der hohen Standardabweichungen lag die berechnete Nachweisgrenze hier bei einer Konzentration von $15,5 \mu\text{M}$ ETP.

Zum weiteren Vergleich wurden zudem die jeweiligen Daten der Methoden bezüglich ihrer Negativkontrolle normalisiert. Die relativen Werte aller vier Dosis-Wirkungskurven sind in Abb. 4.6 dargestellt. Analog zu den absoluten Werten ist ersichtlich, dass die mikroskopische Quantifizierung der γH2AX -Foci die sensitivste Methode darstellt. Die Kurven der drei verbleibenden Parameter/Verfahren verliefen bis zu einer ETP-Konzentration von rund $2,5 \mu\text{M}$ annähernd identisch und lagen auf Höhe der Negativkontrolle. Im weiteren Kurvenverlauf spiegelte dieser die Unterschiede der zuvor bestimmten Nachweisgrenzen der einzelnen Methoden wider.

4.2.2 Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Propidiumiodid-Einbau und [³H]-Thymidin-Zellproliferationstest nach ETP-Behandlung

Zum Vergleich der Ergebnisse aus den γ H2AX-Analysen wurde die Zytotoxizität von ETP mithilfe von zwei etablierten Methoden ermittelt. Hierfür wurde in unstimulierten MNZ gesunder Blutspender zum einen die Zellviabilität, d. h. die Lebensfähigkeit bzw. der prozentuale Anteil lebender Zellen, in Abhängigkeit von der ETP-Dosis durch Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Zum anderen erfolgte nach ETP-Behandlung die Analyse des Proliferationsverhaltens PHA-stimulierter MNZ anhand des [³H]-Thymidin-Einbaus. Im Gegensatz zur einstündigen ETP-Inkubation bei den γ H2AX-Analysen (siehe Kapitel 4.2.1) lag der Endpunkt der genannten Zytotoxizitätsmethoden bei 72 h. Daher wurden zwei Bedingungen in je 5 Versuchen analysiert. Zum einen wurden die Zellen für die Gesamtdauer von 72 h mit den angegebenen Konzentrationen an ETP inkubiert, zum anderen wurde nach 1-stündiger Inkubationszeit das ETP durch zweifaches Waschen entfernt und die Proben anschließend für 72 h bei 37 °C kultiviert.

An unstimulierten MNZ konnte nach 72-stündiger Inkubation bei einer ETP-Konzentration von 10 μ M ein signifikanter ($P < 0,001$) Abfall der Zellviabilität auf $58,3 \pm 3,7$ % und bei einer Konzentration von 100 μ M ETP auf $21,3 \pm 2,5$ % gemessen werden (Abb. 4.7 A). Der Anteil lebender Zellen in der unbehandelten Kontrolle lag bei $91,2 \pm 0,5$ % (Abb. 4.7 B). MNZ, bei denen nach 1-stündiger Inkubation mit 10 μ M ETP das Medium gewechselt wurde, zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Zellviabilität ($89,1 \pm 1,3$ %). Ein signifikanter Rückgang an lebenden Zellen auf $54,3 \pm 1,7$ % konnte hingegen für Zellen nach einstündiger Inkubation mit 100 μ M ETP gemessen werden.

Im Vergleich zur Zellviabilität wurde ein stärkerer Effekt von ETP auf die Proliferation von PHA-stimulierten MNZ beobachtet. Hier wurde die DNA-Synthese bereits bei einer Konzentration von 0,1 μ M ETP um mehr als 50 % inhibiert und sank von 45.646 ± 6.874 cpm bei unbehandelten Zellen auf 22.054 ± 8.782 cpm (Abb. 4.7 C). Mit steigender ETP-Konzentration konnte eine zunehmende Proliferationshemmung auf 3.773 ± 544 cpm (1 μ M), 1.592 ± 339 cpm (10 μ M) bzw. 214 ± 36 cpm (100 μ M) gemessen werden. Wurde das ETP jedoch nach einstündiger Inkubation ausgewaschen, wiesen, analog zur Zellviabilitätsbestimmung, nur noch die Proben eine signifikante Inhibition der DNA-Synthese auf, die zuvor für 1 h mit 100 μ M ETP (9.437 ± 2.475 cpm) inkubiert wurden. Nach Behandlung mit 10 μ M ETP sank die Proliferation der anschließend stimulierten MNZ nicht signifikant auf 30.934 ± 8.071 cpm ab (Abb. 4.7 D).

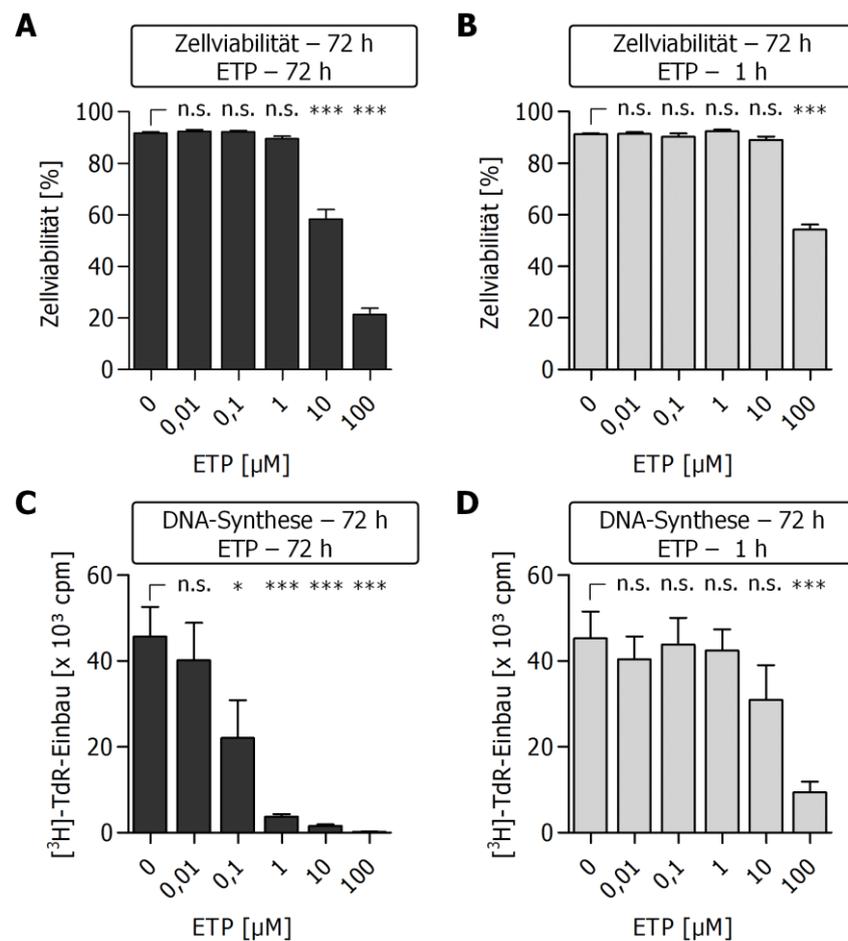


Abb. 4.7: Zytotoxizitätsanalyse nach 72- bzw. 1-stündiger ETP-Behandlung

MNZ wurden entweder 72 h mit der angegebenen ETP-Konzentration behandelt (dunkelgraue Balken, A und C) oder ETP bereits nach 1 h ausgewaschen und die Zellen anschließend für 72 h in frischem Medium inkubiert (hellgraue Balken, B und D). **A)** Zellviabilitätsanalyse unstimulierter MNZ mittels Propidiumiodid-Färbung 72 h nach permanenter bzw. **B)** nach einstündiger Behandlung mit ETP. **C)** Proliferationsanalyse mittels [3 H]-Thymidin-Einbau von PHA-stimulierten MNZ 72 h nach permanenter bzw. **D)** nach einstündiger Inkubation mit der jeweils angegebenen ETP-Konzentration. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 5 unabhängigen Versuchen (***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

4.3 Analysen zur Kinetik Etoposid-induzierter γ H2AX-Foci und deren Reparaturverlauf

Zur weiteren pharmakodynamischen Charakterisierung der Wirkung von ETP in Zusammenhang mit der γ H2AX-Induktion wurden in MNZ gesunder Blutspender die Kinetiken der DSB-Formation sowie das Reparaturverhalten analysiert. Nach Behandlung unstimulierter MNZ mit 5 μ M ETP erfolgte die Untersuchung von zwei Testbedingungen. Zum einen wurden die MNZ über einen Zeitraum von 24 h mit ETP inkubiert und währenddessen die Anzahl an γ H2AX-Foci sowie der Anteil γ H2AX-positiver Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (Abb. 4.8 A, B). Zum anderen wurden die MNZ nach einer einstündigen ETP-Inkubation zweimal gewaschen und anschließend in ETP-freiem Medium resuspendiert. Diese Zellen wurden parallel zu den ETP-haltigen Proben inkubiert und die Anzahl an γ H2AX-Foci zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt.

Das Maximum an DSB wurde nach einer ETP-Inkubation im Zeitintervall von 4 h ($3,08 \pm 0,40$ γ H2AX-Foci/Zelle) bis 8 h ($3,13 \pm 0,50$ Foci/Zelle) gemessen, bevor es, vermutlich ausgelöst durch den Abbau von ETP, zu einer Reduktion der DNA-Schädigung kam. Zellen, bei denen das ETP nach einstündiger Inkubationszeit ($1,11 \pm 0,22$ Foci/Zelle; $50,5 \pm 5,6$ % γ H2AX-positive Zellen) aus dem Medium entfernt wurde, zeigten nach 4 h einen Rückgang an DSB ($0,32 \pm 0,13$ Foci/Zelle) und an γ H2AX-positiven Zellen ($13,8 \pm 4,1$ %). Nach 24 h glichen die Daten dieser Proben denen von unbehandelten Zellen.

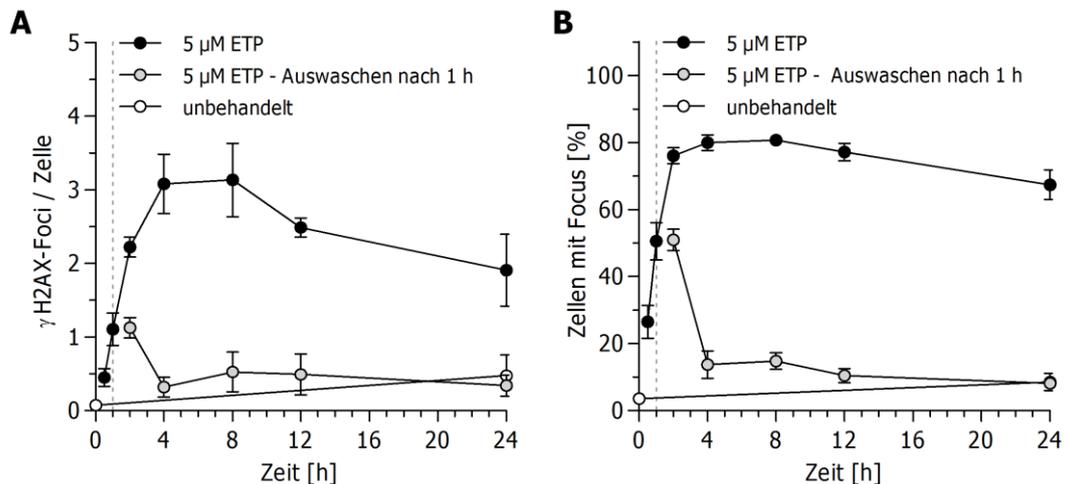


Abb. 4.8: Kinetikanalysen zur Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci nach ETP-Behandlung

MNZ wurden entweder durchgehend für 24 h mit 5 μ M ETP (●) behandelt oder das ETP nach einstündiger Inkubationszeit entfernt (◐) – Waschschrift gekennzeichnet durch vertikale gestrichelte Linie. **A)** Die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle sowie **B)** der prozentuale Anteil an γ H2AX-positiven Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen.

4.4 Genotoxizitätsanalyse mittels γ H2AX-Assay von unterschiedlichen immunsuppressiven Substanzen

Zur Hemmung der Lymphozytenproliferation und zur Unterdrückung von Immunreaktionen, z. B. bei Autoimmunerkrankungen, werden Immunsuppressiva eingesetzt. Diese lassen sich anhand ihres Wirkmechanismus in unterschiedliche Klassen unterteilen. Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CsA), mTor-Inhibitoren wie Rapamycin (Rapa) oder Glucocorticoide wie Dexamethason (Dexa) supprimieren u. a. die Produktion von Zytokinen, die zur Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten benötigt werden. Immunsuppressive Zytostatika interagieren mit der DNA-Biosynthese [114]. Die Verabreichung des aktiven immunsuppressiven Zytokins TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) oder die Behandlung mit Antikörpern gegen das proinflammatorische Zytokin TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) führen ebenfalls zur Inhibition der Immunreaktion.

Im folgenden Versuch sollten immunsuppressiv wirkende Substanzen aus unterschiedlichen Klassen hinsichtlich ihrer genotoxischen Wirkung und der Induktion von DNA-DSB untersucht werden. Vor der γ H2AX-Analyse wurden unstimulierte MNZ über Nacht mit den pharmakologischen Substanzen behandelt. Neben den Immunsuppressiva Cyclosporin A (10 μ M), Rapamycin (10 μ M) und Dexamethason (10 μ M) wurden die Zytostatika Etoposid (10 μ M), Camptothecin (CPT, 2,5 μ M), Daunorubicin (DNR, 50 nM) und Cytarabin (AraC, 2,5 μ M) untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss auf die γ H2AX-Bildung durch Inkubation der MNZ mit aktivem TGF- β 1 (10 ng/ml) bzw. mit einem Antikörper gegen TNF α (anti-TNF α , Golimumab, 100 μ g/ml) analysiert.

Die Immunsuppressiva wurden in einem Konzentrationsbereich angewendet, in dem bereits bei der DNA-Synthese hemmende Effekte beschrieben wurden [149]. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der Zytostatika von anfangs 10 μ M soweit reduziert, bis bei der mikroskopischen Analyse jeweils ein vergleichbares Niveau an γ H2AX-Foci induziert wurde. Ein signifikanter Anstieg ($P < 0,001$) an γ H2AX-Foci/Zelle konnte mittels automatisiertem γ H2AX-Immunfluoreszenztest nur bei der Gruppe der Zytostatika beobachtet werden (Abb. 4.9 A). Mittels Western-Blot-Analyse wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung des γ H2AX-Niveaus nur nach Zytostatikabehandlung detektiert, jedoch unterschieden sich die Anstiege beider Methoden (Abb. 4.9 B). Der starke Anstieg der γ H2AX-Konzentration im Western-Blot nach Inkubation der MNZ mit CPT und AraC spiegelte nicht nur die Zahl der γ H2AX-Foci, sondern vor allem die Rate pan-nukleär gefärbter Zellen wider. Repräsentative Mikroskopaufnahmen sowie der Anteil pan-nukleär gefärbter MNZ nach Zytostatikabehandlung sind unterhalb der Daten aus der automatisierten γ H2AX-Analyse in Abb. 4.9 A gezeigt.

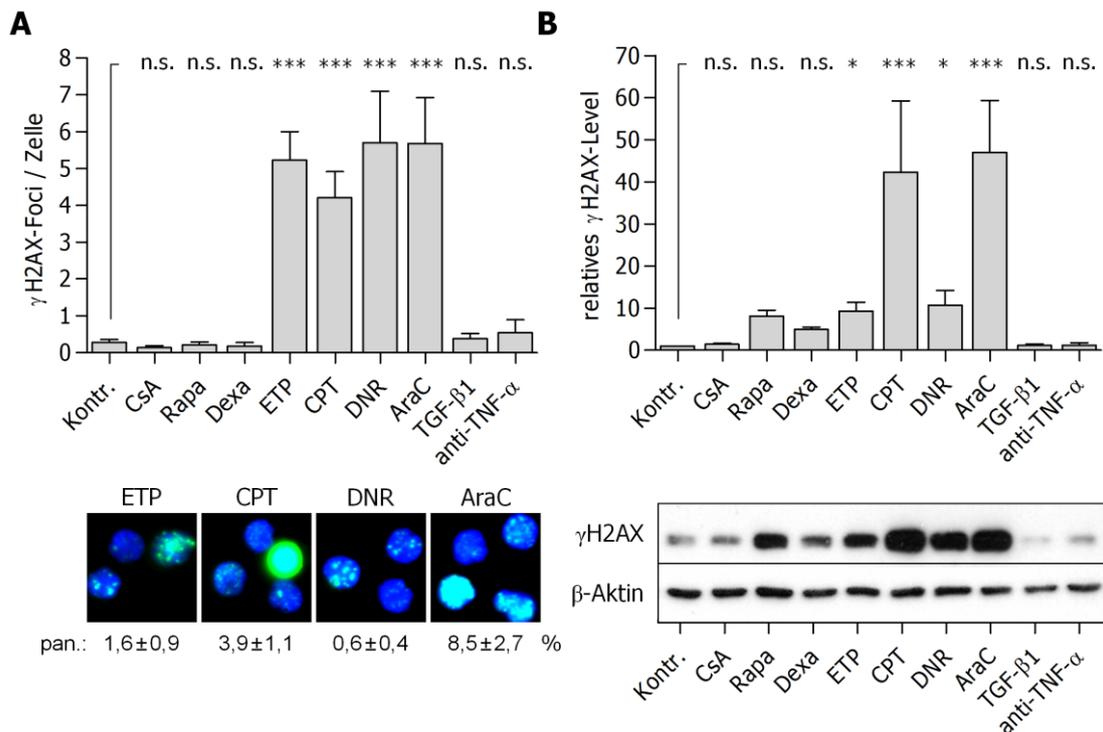


Abb. 4.9: γH2AX-Analyse nach Behandlung von MNZ mit Immunsuppressiva

Unstimulierte MNZ wurden über Nacht mit Cyclosporin-A (CsA, 10 μM), Rapamycin (Rapa, 10 μM), Dexamethason (Dexa, 10 μM), den Zytostatika Etoposid (ETP, 10 μM), Camptothecin (CPT, 2,5 μM), Daunorubicin (DNR, 50 nM) und Cytarabin (AraC, 2,5 μM) oder mit aktivem TGF-β1 (10 ng/ml) bzw. mit einem Antikörper gegen TNF-α (anti-TNFα, 100 μg/ml) inkubiert. **A)** Oben: γH2AX-Foci/Zelle quantifiziert mithilfe der automatisierten Mikroskopie. Unten: Repräsentative Beispielaufnahmen nach Zytostatikabehandlung sowie die prozentuale Angabe pan-nukleär (pan.) gefärbter Zellen/Probe **B)** Oben: Darstellung des relativen γH2AX-Niveaus bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach Western-Blot-Analyse. Unten: Repräsentativer Western-Blot. Diagramme zeigen die MW ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten (***: $P \leq 0,001$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

Während bei der mikroskopischen Auswertung pan-nukleäre Zellen aus der Analyse ausgeschlossen und separat aufgeführt wurden, konnte beim Western-Blot-Verfahren keine Differenzierung getroffen werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Anteil pan-gefärbter Zellen daher nicht als Artefakt bei der mikroskopischen Auswertung ignoriert werden darf. Eine genaue Analyse apoptotischer Zellen ist jedoch anhand der pan-nukleär gefärbten Zellen nicht möglich. Diese kann nur durch Anwendung apoptosespezifischer Biomarker gewährleistet werden.

Nach Inkubation mit AraC wiesen $8,5 \pm 2,7$ % der MNZ einen pan-gefärbten Nukleus auf. Da die zuvor beschriebene Obergrenze für die Foci-Quantifizierung von 5 % an pan-nukleär gefärbten Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht definiert war, wurden die Proben in diesem Versuch noch mit in die γH2AX-Foci-Quantifizierung integriert.

4.5 Untersuchungen zur Eignung des γ H2AX-Assays als Chemosensibilitätstest

4.5.1 Bestimmung der Effluxaktivität mittels Rhodamin-123

Ein Problem bei der Chemotherapie ist das Auftreten von Zytostatikaresistenzen. Wie viele andere Arzneistoffe werden auch zahlreiche Chemotherapeutika über ABC-Transporter aus der Zelle transportiert und somit ihre Zytotoxizität reduziert. Ein modulierender Effekt auf die Chemosensibilität konnte in Kombination mit sogenannten Chemosensibilisatoren gezeigt werden, welche durch Inhibition der ABC-Transporter eine Akkumulation der Zytostatika im Zellinneren hervorrufen und somit der Zytostatikaresistenz entgegenwirken [115]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Immunsuppressiva CsA und Rapamycin ABC-Transporter in MNZ inhibieren. Anschließend wurde analysiert, inwiefern mithilfe des γ H2AX-Assays eine dadurch erhöhte Chemosensibilität der MNZ gegenüber Etoposid nachzuweisen ist.

Zu Beginn wurde mittels Rhodamin-123-Effluxtest untersucht, ob die Aktivität des P-gp-Transporters durch die Immunsuppressiva CsA oder Rapa inhibiert werden kann. Hierzu wurden MNZ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 (Rho 123) inkubiert, welcher als Substrat für den ABC-Transporter P-gp beschrieben ist. Nach 1 h wurde durchflusszytometrisch die intrazelluläre Rhodaminkonzentration anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt (Abb. 4.10 A) und diese als Ausgangswert ($t_0 = 100\%$) für die darauffolgenden Effluxuntersuchungen nach 30 min, 60 min und 120 min genutzt. Nach der Farbstoffaufnahme wurden die Zellen gewaschen und anschließend in An- oder Abwesenheit von $10\ \mu\text{M}$ CsA bzw. $10\ \mu\text{M}$ Rapa inkubiert. Die Mittelwerte der P-gp-Aktivitätsmessung von vier unabhängigen Versuchen sind in Abb. 4.10 B und die Histogramme der Rhodaminintensität für einen repräsentativen Versuch in Abb. 4.10 C gezeigt. Nach 30 min sank die intrazelluläre Fluoreszenzintensität bei Zellen, die mit CsA behandelt wurden, auf $83,4 \pm 2,1\%$ und nach Inkubation mit $10\ \mu\text{M}$ Rapa auf $84,3 \pm 1,5\%$ ab. Bei Zellen, die nur in Medium resuspendiert wurden, konnte eine stärkere Reduktion des Rhodamingehalts auf $69,5 \pm 2,2\%$ gemessen werden. Signifikante Unterschiede in der Effluxaktivität konnten zwischen den Proben, die ohne oder mit CsA bzw. Rapa behandelt wurden, vor allem nach 60 min und 120 min beobachtet werden. Während die intrazelluläre Rhodaminkonzentration der unbehandelten Zellen nach 60 min ($58,4 \pm 4,0\%$) und 120 min ($37,1 \pm 7,3\%$) weiter sank, stagnierte indes der Rhodaminexport bei den Proben, die mit einem der beiden Immunsuppressiva inkubiert wurden. Dieser Versuch bestätigte eine Hemmung des Rhodaminefflux bzw. der P-gp-Transporteraktivität durch die Zugabe von $10\ \mu\text{M}$ CsA bzw. $10\ \mu\text{M}$ Rapa.

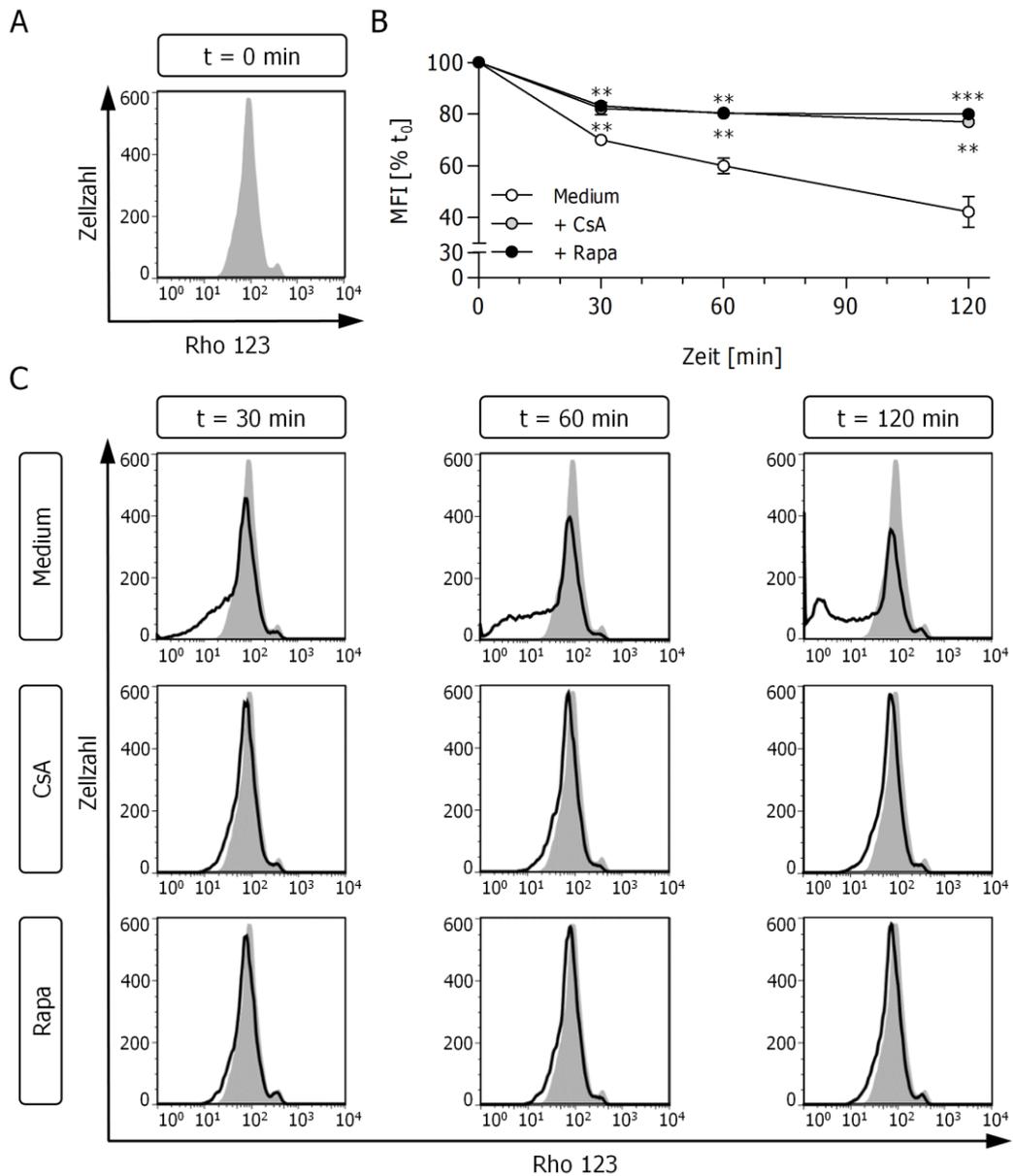


Abb. 4.10: Bestimmung der ABC-Transporteraktivität mittels Rhodamin-123-Effluxassay

Isolierte MNZ gesunder Spender wurden für 1 h mit dem fluoreszierenden P-gp-Substrat Rhodamin-123 behandelt. Nach Entfernung von extrazellulärem Rhodamin-123 wurden die Zellen in Medium mit oder ohne Zugabe von 10 μ M CsA bzw. 10 μ M Rapa inkubiert. Die intrazelluläre Rhodaminkonzentration wurde durchflusszytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert. **A)** Repräsentatives Histogramm der initialen Rhodamin-Intensität zum Zeitpunkt t_0 . **B)** Intrazelluläre Fluoreszenzintensitäten 30 min, 60 min und 120 min nach Ende der Rhodaminaufnahme, bezogen auf die Ausgangskonzentration ($t_0 = 100\%$). Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen (***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$). **C)** Histogramm der einzelnen Bedingungen und Zeitpunkte eines repräsentativen Versuches (grau gefüllt: Ausgangsintensität (t_0), schwarze Kurve: Intensität der angegebenen Kondition).

4.5.2 Bestimmung der Zytostatikasensibilität mittels γ H2AX-Analyse

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob der gezeigte inhibierende Effekt von CsA bzw. Rapa auf die Effluxaktivität mithilfe der automatisierten γ H2AX-Analyse durch eine veränderte Chemosensibilität der MNZ gegenüber ETP detektiert werden kann.

Einfluss von CsA und Rapa auf die Bildung ETP-induzierter γ H2AX-Foci

Um die Wechselwirkung zwischen den Substanzen zu untersuchen, wurden unstimulierte MNZ in Medium allein oder mit 10 μ M CsA bzw. 10 μ M Rapa über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die drei Proben zweigeteilt und jeweils eine Hälfte ohne ETP und die andere Hälfte für 1 h mit 5 μ M ETP behandelt. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Färbung und Analyse der γ H2AX-Foci (Abb. 4.11).

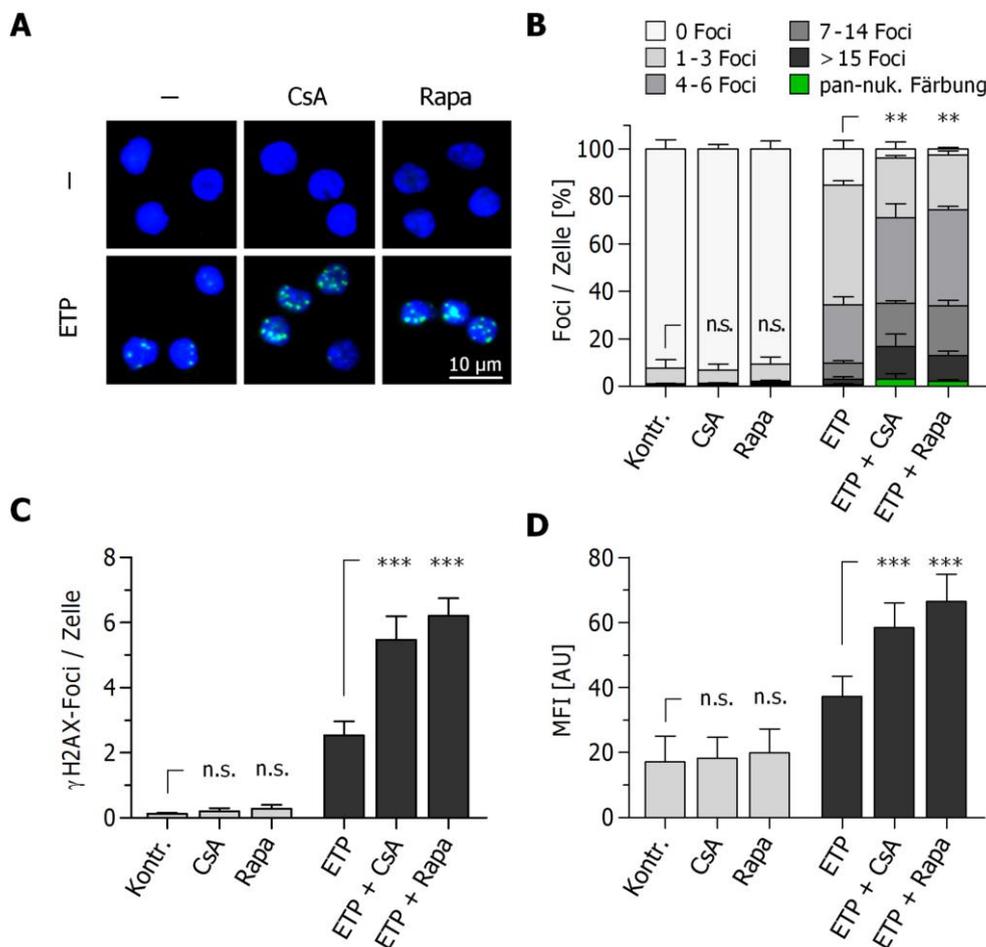


Abb. 4.11: Modulierte ETP-Sensibilität von MNZ nach Ko-Inkubation mit CsA bzw. Rapa
 Unstimulierte MNZ wurden über Nacht in Medium (Kontr.), in 10 μ M CsA oder 10 μ M Rapa inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben zweigeteilt und jeweils ein Teil ohne (hellgrau Balken) und ein Teil für 1 h mit 5 μ M ETP (dunkelgrau Balken) behandelt. Anschließend wurde die ETP-Toxizität mittels γ H2AX-Analyse bestimmt. **A)** Repräsentative Mikroskopaufnahmen der einzelnen Proben nach DAPI- (blau) und γ H2AX-Färbung (grün). **B)** Prozentuale Verteilung der γ H2AX-Foci, **C)** Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle und **D)** γ H2AX-Fluoreszenzintensität. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 6 unabhängigen Experimenten (***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; n.s.: $P > 0,05$).

Im Vergleich zu unbehandelten MNZ, die im Mittel $0,12 \pm 0,03$ Foci/Zelle aufwiesen, gab es keine signifikanten Unterschiede bei Zellen, die über Nacht entweder mit $10 \mu\text{M}$ CsA ($0,20 \pm 0,10$ Foci/Zelle) oder $10 \mu\text{M}$ Rapa ($0,27 \pm 0,12$ Foci/Zelle) behandelt wurden (Abb. 4.11 C, hellgraue Balken). Darüber hinaus wurden weder Differenzen im Anteil γH2AX -positiver Zellen noch in der Fluoreszenzintensität der ETP-freien Proben detektiert (Abb. 4.11 B, D). Nach Zugabe von $5 \mu\text{M}$ ETP stieg die Anzahl der γH2AX -Foci auf $2,53 \pm 0,42$ Foci/Zelle an. Ein signifikant erhöhter Anstieg an DNA-DSB, um mehr als 100 %, wurde bei den Proben ermittelt, die zuvor mit CsA ($5,47 \pm 0,72$ Foci/Zelle) oder Rapa ($6,20 \pm 0,54$ Foci/Zelle) inkubiert wurden (Abb. 4.11 C, schwarze Balken). Diese signifikante Zunahme der ETP-Toxizität nach Ko-Inkubation mit CsA bzw. Rapa wurde ebenfalls beim Anteil γH2AX -positiver Zellen sowie bei der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abb. 4.11 B, D).

Zur Untersuchung einer dosisabhängigen Steigerung der ETP-Sensibilität wurden in weiteren Versuchen MNZ über Nacht mit unterschiedlichen Konzentrationen an CsA bzw. Rapa ($0,1 - 10 \mu\text{M}$) behandelt und die Proben am Folgetag für 1 h mit $5 \mu\text{M}$ ETP inkubiert. Die Auswertungen belegten einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an CsA bzw. Rapa und dem Anstieg an ETP-induzierten γH2AX -Foci/Zelle (Abb. 4.12).

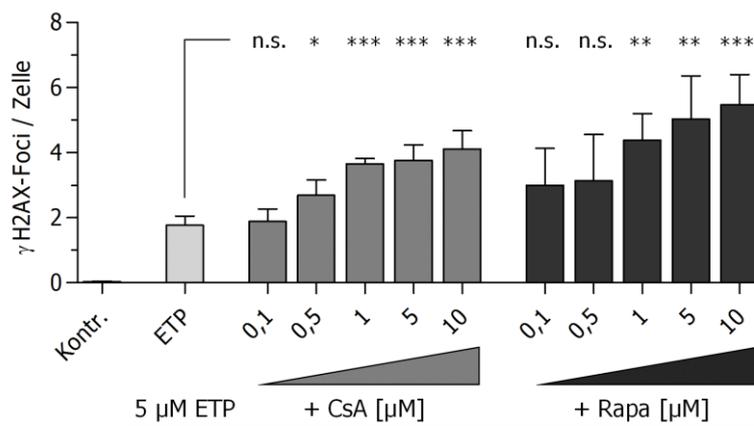


Abb. 4.12: Modulierte ETP-Sensibilität der MNZ und Induktion von γH2AX -Foci in Abhängigkeit von der Konzentration an CsA bzw. Rapa

Unstimulierte MNZ wurden über Nacht mit den angegebenen Konzentrationen an CsA bzw. Rapa inkubiert und die Proben zur Induktion von DNA-DSB am Folgetag für 1 h mit $5 \mu\text{M}$ ETP behandelt. Anschließend wurde die ETP-Sensibilität der MNZ mittels γH2AX -Analyse bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Chemosensibilität der MNZ nicht nur bei Präexposition von CsA bzw. Rapa über Nacht, sondern bereits 1 h nach zeitgleicher Inkubation mit P-gp-Inhibitor (10 μ M) und 5 μ M ETP erfolgte (Abb. 4.13 A). Im Vergleich zur ETP-Behandlung allein ($3,30 \pm 0,47$ Foci/Zelle) wiesen die Proben mit P-gp-Modulator (ETP + CsA: $5,35 \pm 0,26$ Foci/Zelle; ETP + Rapa: $8,05 \pm 1,24$ Foci/Zelle) erneut einen signifikanten Anstieg an DSB auf. Dieser Anstieg war, wie Kinetikuntersuchungen über ein Zeitintervall von 0,5 h bis 24 h mit ETP \pm CsA zeigten, von Beginn der Ko-Inkubation an detektierbar und hielt über den gesamten Zeitraum an (Abb. 4.13 B).

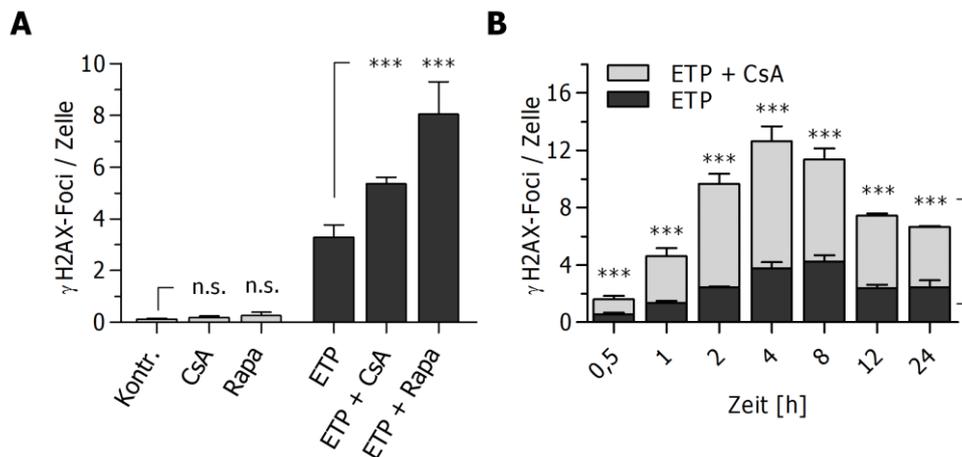


Abb. 4.13: Modulierte ETP-Sensibilität der MNZ und Induktion von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

A) Unstimulierte MNZ wurden zeitgleich für 1 h mit 10 μ M CsA bzw. 10 μ M Rapa und mit 5 μ M ETP inkubiert und die Anzahl induzierter γ H2AX-Foci bestimmt. **B)** Zeitverlauf der γ H2AX-Foci-Induktion nach Inkubation mit 5 μ M ETP in An- oder Abwesenheit von 10 μ M CsA. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (***: $P \leq 0,001$; n.s.: $P > 0,05$).

Einfluss von CsA und Rapa auf Daunorubicin- und strahleninduzierte γ H2AX-Foci

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die Substitution von ETP durch das Zytostatikum Daunorubicin (DNR). Bei DNR handelt es sich wie bei ETP um einen Topoisomerase-II-Inhibitor, welcher ebenfalls als P-gp-Substrat beschrieben wurde. Im Vergleich zur Einzelinkubation mit 50 nM DNR über Nacht ($4,11 \pm 0,34$ Foci/Zelle) führte die Kombination von 50 nM DNR mit 10 μ M CsA ($6,19 \pm 0,48$ Foci/Zelle) bzw. 10 μ M Rapa ($6,65 \pm 0,67$ Foci/Zelle) erneut zu einem signifikanten Anstieg der induzierten γ H2AX-Foci (Abb. 4.14 A (obere Reihe), B).

Um den Zusammenhang zwischen der gesteigerten Zytostatikasensibilität der MNZ und dem inhibierenden Einfluss von CsA und Rapa auf ABC-Transporter weiter aufzuklären, wurden in einem Experiment die DSB nicht durch Zytostatika, sondern mittels Gammabestrahlung induziert. Hierzu wurden MNZ in Medium ohne bzw. mit 10 μ M CsA oder 10 μ M Rapa aufgenommen, über Nacht inkubiert und die Proben am Folgetag mit 0,2 Gy bestrahlt. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden die induzierten γ H2AX-Foci bestimmt. Zwischen den Proben nach Inkubation ohne ($2,86 \pm 0,57$ Foci/Zelle) und mit CsA ($2,40 \pm 0,52$ Foci/Zelle) bzw. Rapa ($2,64 \pm 0,66$ Foci/Zelle) konnten keine signifikanten Unterschiede der ermittelten γ H2AX-Foci detektiert werden (Abb. 4.14 A (untere Reihe), C).

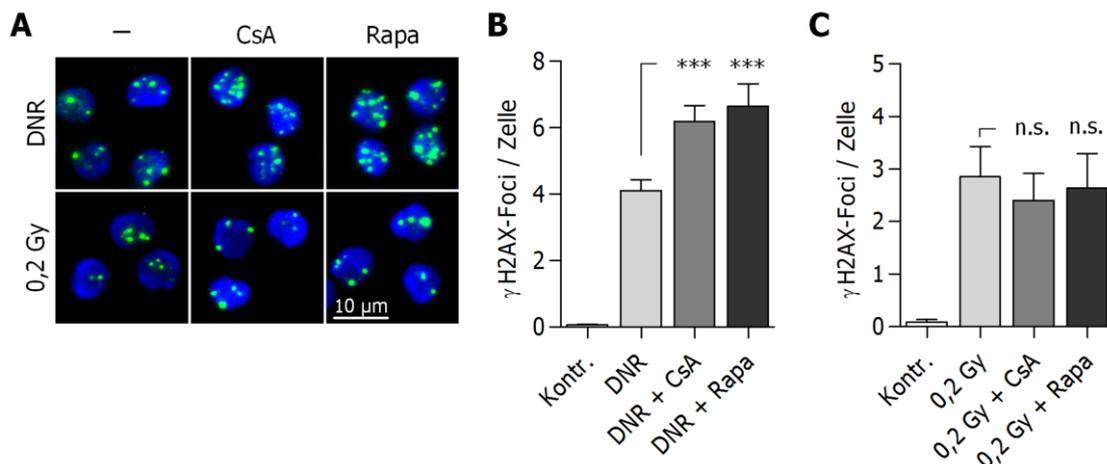


Abb. 4.14: Einfluss von CsA und Rapa auf Daunorubicin- und strahleninduzierte DSB

A) Repräsentative Mikroskopaufnahmen der in B) und C) quantifizierten Proben zeigen DAPI-gefärbte Zellkerne (blau) mit γ H2AX-Foci (grün). **B)** Anzahl an γ H2AX-Foci in unstimulierten MNZ nach 16-stündiger Inkubation mit 50 nM Daunorubicin (DNR) allein oder in Kombination mit 10 μ M CsA bzw. 10 μ M Rapa. **C)** Anzahl an γ H2AX-Foci 1 h nach Gammabestrahlung mit 0,2 Gy. Die MNZ wurden zuvor für 16 h in Medium mit oder ohne Zusatz von 10 μ M CsA bzw. 10 μ M Rapa inkubiert. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten (n.s.: $P > 0,05$; ***: $P \leq 0,001$).

Einfluss von CsA und Rapa auf die Reparatur ETP- und strahleninduzierter DSB

In weiteren Experimenten sollte der Einfluss von 10 μM CsA bzw. Rapa auf die Reparatur von DNA-DSB untersucht werden. Zur Induktion der γH2AX -Foci erfolgte entweder eine Inkubation der MNZ mit 5 μM ETP oder eine Bestrahlung mit 0,2 Gy. Das ETP wurde nach einer einstündigen Behandlung durch zwei Waschschrte aus den Proben entfernt. Nach Herbeiführen der DNA-DSB wurden die Zellen in jeweils drei Proben unterteilt. Eine Probe wurde über Nacht allein in Medium, die zweite mit 10 μM CsA und die dritte Probe mit 10 μM Rapa bei 37°C inkubiert. Nach 20 h erfolgte die Bestimmung der residualen Foci (Abb. 4.15 A, B). Bei den ETP-behandelten Proben betrug die Anzahl an verbleibenden DSB $0,12 \pm 0,05$ Foci/Zelle (Medium), $0,12 \pm 0,10$ Foci/Zelle (CsA) bzw. $0,15 \pm 0,09$ Foci/Zelle (Rapa), bei den Proben nach Bestrahlung wurden $0,24 \pm 0,09$ Foci/Zelle (Medium), $0,24 \pm 0,10$ Foci/Zelle (CsA) und $0,36 \pm 0,15$ Foci/Zelle (Rapa) detektiert.

Im Vergleich zum initialen Wert (1 h) war nach 20 h anhand der reduzierten γH2AX -Foci eine DSB-Reparatur deutlich erkennbar. Hierbei war jedoch kein signifikanter Einfluss von CsA bzw. Rapa zu ersichtlich. Während 20 h nach ETP-Entfernung alle behandelten Proben vergleichbare Werte an γH2AX -Foci erreichten wie unbehandelte MNZ (Abb. 4.15 A), wiesen alle gammabestrahlten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe noch signifikant erhöhte DSB-Werte auf (Abb. 4.15 B).

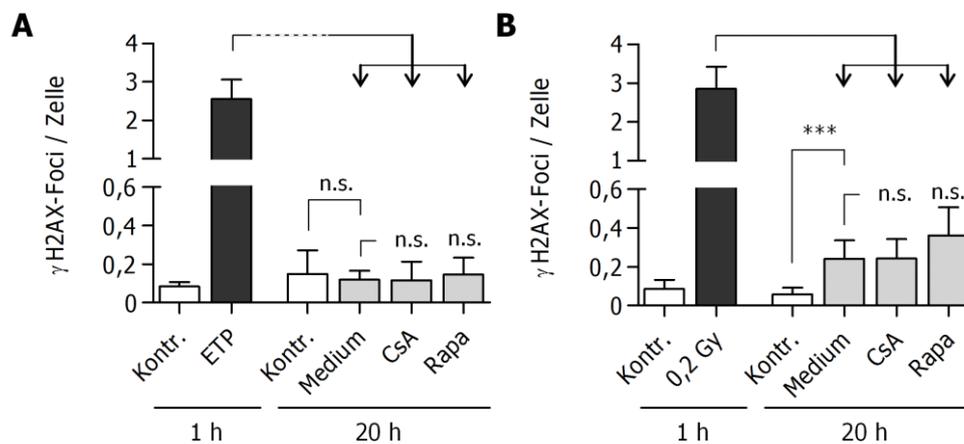


Abb. 4.15: Einfluss von CsA und Rapa auf die Reparatur ETP- bzw. strahleninduzierter DSB

Zur Induktion von DNA-DSB wurden unstimulierte MNZ entweder **A)** mit 5 μM ETP behandelt und dieses nach 1 h durch Waschschrte entfernt oder **B)** die DSB durch Gammabestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 0,2 Gy hervorgerufen. Anschließend wurden die initialen γH2AX -Foci bestimmt (schwarze Balken) und die restlichen Proben dreigeteilt (Pfeile). Ein Teil der Zellen wurde in Medium allein, ein Teil mit 10 μM CsA und ein Teil mit 10 μM Rapa inkubiert und nach 20 h die Anzahl residualer Foci bestimmt (graue Balken). Kontrollen, die weder mit ETP behandelt noch bestrahlt wurden, sind als weiße Balken abgebildet. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (n.s.: $P > 0,05$; ***: $P \leq 0,001$).

4.6 Dosisabhängige Zytotoxizität und Induktion von γ H2AX-Foci nach Gammabestrahlung von MNZ

4.6.1 Zytotoxische Wirkung von Gammastrahlen auf MNZ

Neben chemischen Noxen stellt ionisierende Strahlung eine weitere Hauptursache für exogen induzierte DNA-Läsionen dar. Im folgenden Versuch wurde die Zellviabilität mittels PI-Färbung 1 h, 24 h und 72 h nach Bestrahlung von unstimulierten MNZ mit einer Dosis von 0 Gy, 0,2 Gy, 2 Gy bzw. 20 Gy gemessen. Wie in Abb. 4.16 dargestellt, können Gammastrahlen dosisabhängig die Zellviabilität reduzieren.

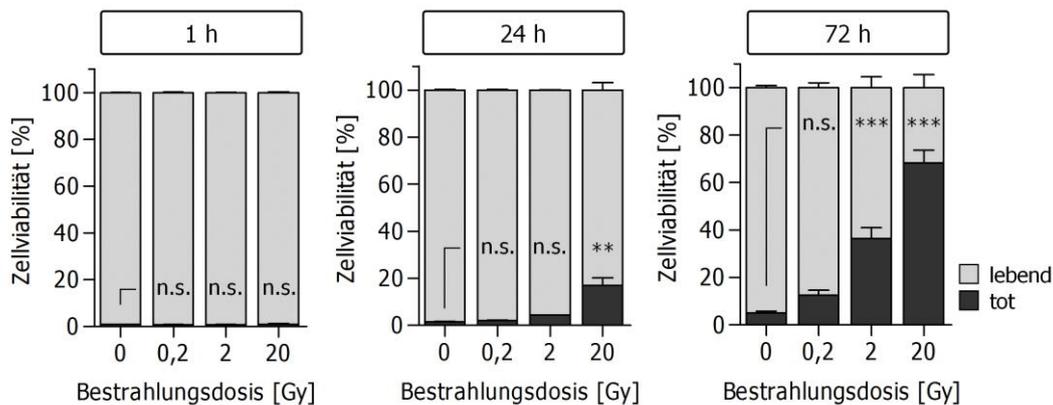


Abb. 4.16: Zellviabilität γ -bestrahlter MNZ in Abhängigkeit von der Dosis und Zeit

Unstimulierte MNZ wurden *in vitro* mit 0 Gy, 0,2 Gy, 2 Gy oder 20 Gy bestrahlt und das Verhältnis an lebenden und toten Zellen mittels PI-Färbung 1 h, 24 h und 72 h nach Strahlenexposition bestimmt. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen (n.s.: $P > 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$).

4.6.2 Induktion und Reparatur von DNA-DSB nach Gammabestrahlung

Ein Großteil der durch geringe ionisierende Strahlung induzierten Schäden ist reversibel und kann von Zellen mit intakten DNA-Reparaturmechanismen behoben werden. Bei biodosimetrischen Analysen nach ionisierender Bestrahlung wird der γ H2AX-Assay als schnelle Methode zum Nachweis von DNA-DSB genutzt. Der zeitliche Verlauf der γ H2AX-Foci-Induktion bzw. die Kinetik der DSB-Reparatur sind in Abb. 4.17 dargestellt. Hierzu wurden unstimulierte MNZ mit unterschiedlichen Dosen (0 Gy; 0,2 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy; 2 Gy; 5 Gy) bestrahlt und die Foci zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Wie bereits aus den Mikroskopaufnahmen in Abb. 4.17 A erkennbar ist, wiesen direkt nach der Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 5 Gy mehr als 5 % der Zellen eine pan-nukleäre Färbung auf (Abb. 4.17 B). Diese Proben mussten von der Focus-Quantifizierung ausgeschlossen werden.

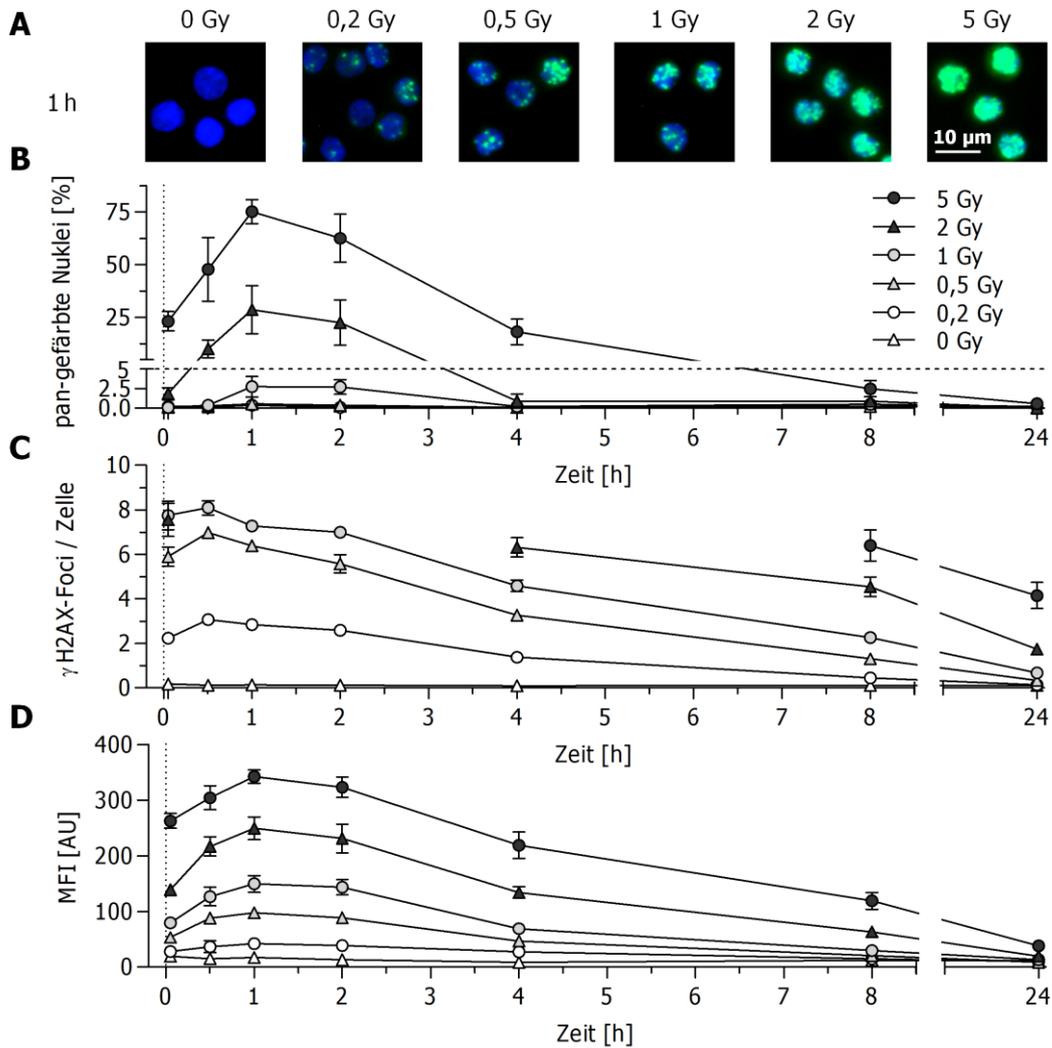


Abb. 4.17: Dosisabhängige Induktion und Kinetik strahleninduzierter γ H2AX-Foci

Zeitverlauf des γ H2AX-Niveaus nach Gammabestrahlung von unstimulierten MNZ mit den angegebenen Dosen zwischen 0,2 Gy und 5 Gy. **A**) Automatisiert erstellte Mikroskopaufnahmen der DAPI-gefärbten Zellkerne (blau) und γ H2AX-Foci (grün) 1 h nach Bestrahlung. **B**) Prozentualer Anteil an Zellen mit pan-gefärbten Nuklei. Proben, die mehr als 5 % pan-gefärbte Zellen aufwiesen, wurden von der automatisierten γ H2AX-Foci-Quantifizierung ausgeschlossen. Der Grenzwert (5 %) ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. **C**) Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle der quantifizierbaren Proben und **D**) γ H2AX-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und Zeit. Dargestellt sind MW \pm SEM von 3 unabhängigen Versuchen.

Abhängig von der Bestrahlungsdosis konnten Unterschiede in der Anzahl quantifizierter Foci und der gemessenen γ H2AX-Intensitäten beobachtet werden (Abb. 4.16 C, D). Während innerhalb der ersten 30 – 60 min nach Bestrahlung die Anzahl an γ H2AX-Foci anstieg, spiegeln sich im anschließenden Kurvenabfall die einsetzenden Reparaturprozesse wider. Messungen 8 h und 24 h nach Exposition ermöglichten darüber hinaus die Quantifizierung von DNA-DSB auch in 2 Gy- und 5 Gy-bestrahlten MNZ. Trotz des Rückgangs initialer Foci konnten dosisabhängige Unterschiede in der Foci-Anzahl detektiert werden.

4.7 Analysen zum genotoxischen Potential der Hochfeld- und Ultrahochfeld-MRT

4.7.1 In-vitro-Studie zur Untersuchung von genotoxischen und zytotoxischen Effekten nach 7 T-Ultrahochfeld-MRT

In der folgenden Studie wurden MNZ von 16 gesunden Blutspendern isoliert und in jeweils sechs Proben unterteilt. Diese wurden anschließend unterschiedlichen Expositionen ausgesetzt. Eine der Proben blieb unbehandelt, einer weitere Probe wurde für 1 h im reinen statischen Magnetfeld des 7 T-MRT ($7\text{ T} - B_0$) exponiert und eine dritte nach einstündigem 7 T-MRT mit EPI-Sequenzen ($7\text{ T} - \text{EPI}$) analysiert. Bei Letzterer erfolgte die Exposition daher nicht nur gegenüber dem statischen Magnetfeld, sondern in Kombination mit den für die Bildgewinnung notwendigen Hochfrequenzfeldern und Gradientenfeldern. Um einen möglichst großen Effekt zu erzeugen, wurden diese entsprechend der maximal zulässigen Stärken eingestellt. Als Positivkontrollen dienten Proben nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Die MNZ sind diesbezüglich entweder in einem CT-Scanner mit einer durchschnittlichen Bestrahlungsdosis von 37,4 mGy oder mit Gammastrahlen einer Dosis von 0,2 Gy bzw. 30 Gy behandelt worden.

Genotoxizitätsanalyse

Zur Untersuchung von DNA-DSB wurden die Proben nach γH2AX -Färbung sowohl am Durchflusszytometer als auch mikroskopisch am AKLIDES-System analysiert. Die Färbung erfolgte am Tag 1 sowohl direkt nach den Behandlungen (0 h), als auch nach einstündiger Inkubation der Zellen bei 37 °C sowie an Tag 2, 20 h nach Exposition.

Bei der γH2AX -Analyse mittels Durchflusszytometrie konnten direkt nach der Behandlung (0 h) keine Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle (414 ± 58 AU) und Zellen nach 7 T-MRT-Exposition (B_0 : 412 ± 59 AU; EPI: 414 ± 63 AU) beobachtet werden (Abb. 4.18). Während in Zellen nach CT-Scan nur ein geringer Anstieg der γH2AX -Fluoreszenzintensität auf 442 ± 59 AU gemessen wurde, wiesen Zellen nach Gammastrahlung mit 0,2 Gy einen signifikant erhöhten Wert von 765 ± 101 AU auf. Proben, die zur verbesserten Phosphorylierung der H2AX-Moleküle nach der Behandlung für 1 h bei 37°C inkubiert wurden, zeigten eine leichte Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Dies führte vor allem bei den CT- und 0,2 Gy-bestrahlten Zellen zu einer Vergrößerung der Intensitätsdifferenz, allerdings nicht zu Änderungen der berechneten Signifikanzbereiche bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Daten aller Proben, die 20 h nach der Behandlung entnommen wurden, unterschieden sich nicht signifikant von der Negativkontrolle (1042 ± 113 AU), da aufgrund der eingesetzten DNA-Reparatur auch die γH2AX -Intensität der mit 0,2 Gy bestrahlten Zellen (1256 ± 121 AU) zurückging.

Im Vergleich zu den an Tag 1 fixierten Zellen (0 h, 1 h) war bei allen Proben, die 20 h nach der Exposition untersucht wurden, eine erhöhte γ H2AX-Fluoreszenzintensität messbar. Diese spiegelt jedoch nicht unmittelbar eine Zunahme an γ H2AX-Foci wider, sondern kann auch auf unterschiedliche Fixierungsbedingungen zurückzuführen sein. Während die an Tag 1 untersuchten Zellen über Nacht bei 4°C in Ethanol fixiert wurden, erfolgte die Fixierung bei Proben an Tag 2 (Fixierung 20 h nach Exposition) nur für 20 min bei 22 °C. Zusätzliche Experimente zeigten, dass eine Ethanolfixierung über Nacht (Tag 1) die Autofluoreszenz der Zellen herabsetzte, weshalb die Hintergrundintensität der an Tag 2 fixierten Proben erhöht war. Da jedoch nur jeweils Proben desselben Zeitpunktes miteinander verglichen wurden, hatte dieser Effekt keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

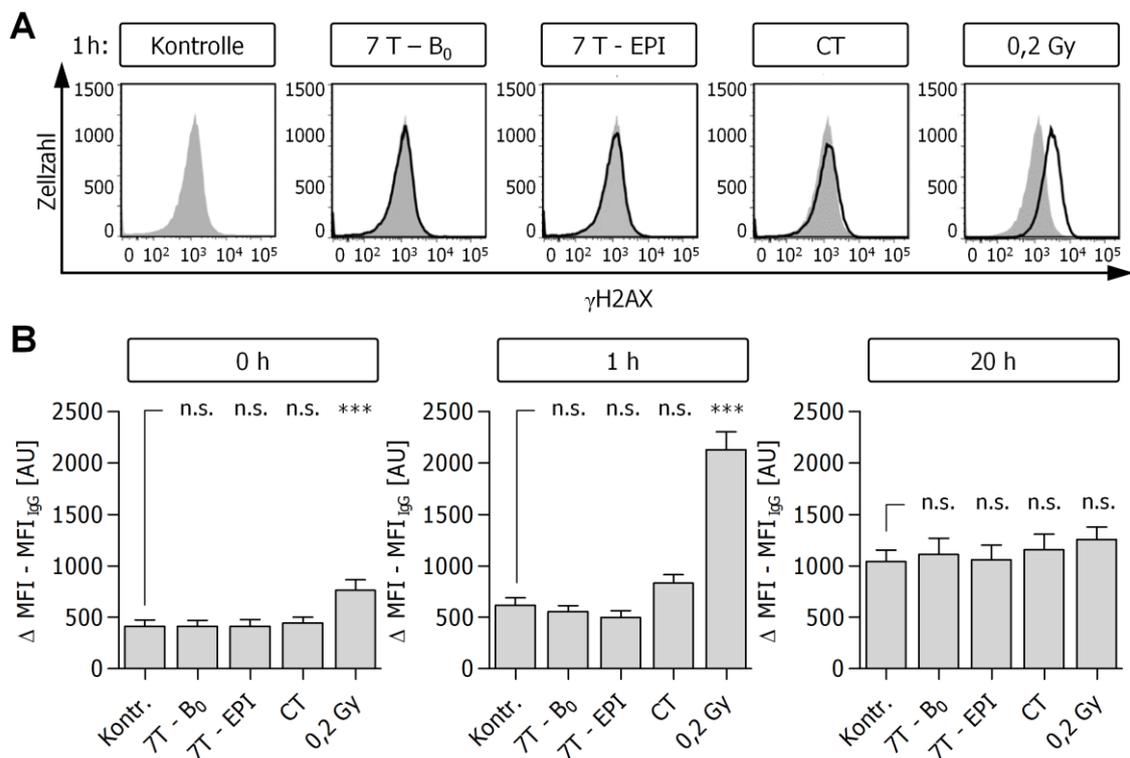


Abb. 4.18: Durchflusszytometrische γ H2AX-Analyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht-ionisierender und ionisierender Strahlung

Bestimmung der γ H2AX-Fluoreszenzintensität in unstimulierten MNZ direkt (0 h) sowie 1 h und 20 h nach angegebener Exposition (unbehandelte Kontrolle; 7 T-MRT: nur B₀-Feld oder B₀-Feld+EPI; CT mit ~37,4 mGy Röntgenstrahlen; 0,2 Gy Gammastrahlen). **A**) Die Histogramme der γ H2AX-Intensität eines repräsentativen Versuchs zeigen die Intensitätsverteilung der Kontrolle (grau gefüllt) und die der exponierten Proben (schwarze Linie). **B**) Mittlere γ H2AX-Intensität zu den drei analysierten Zeitpunkten, berechnet aus der Differenz zur individuellen IgG-Isotyp-Kontrolle (t = 0 h). Dargestellt sind die MW \pm SEM aus je 16 unabhängigen Versuchen (***: P \leq 0,001; **: P \leq 0,01; *: P \leq 0,05; n.s.: P > 0,05).

Neben der Durchflusszytometrie erfolgte die γ H2AX-Analyse parallel mittels automatisierter Mikroskopie (Abb. 4.19). Die ermittelten Intensitätsdaten aus der Mikroskopie ähnelten im Verlauf und in den Signifikanzberechnungen denen der Durchflusszytometrie (Abb. 4.19 B).

Unterschiede zeigten sich hingegen bei der Foci-Quantifizierung (Abb. 4.19 C). Im Vergleich zur Kontrolle ($0,058 \pm 0,015$ Foci/Zelle) konnten nach 1 h zwar erneut keine signifikanten Veränderungen nach 7 T-MRT-Exposition (7 T-B₀: $0,065 \pm 0,016$ Foci/Zelle; 7 T-EPI: $0,057 \pm 0,014$ Foci/Zelle) ermittelt werden, jedoch war ein signifikanter Anstieg an γ H2AX-Foci sowohl nach CT-Scan ($0,377 \pm 0,094$ Foci/Zelle) als auch nach Gammabestrahlung mit 0,2 Gy ($2,101 \pm 0,525$ Foci/Zelle) detektierbar. Bei der Anzahl an γ H2AX-Foci konnten zwischen den Proben, die direkt nach Exposition (0 h) und 1 h nach Exposition fixiert wurden, keine Unterschiede beobachtet werden. Darüber hinaus war 20 h nach Exposition mittels automatisierter Foci-Quantifizierung noch ein signifikanter Anstieg an γ H2AX-Foci bei γ -bestrahlten MNZ ($0,267 \pm 0,034$ Foci/Zelle) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($0,088 \pm 0,017$ Foci/Zelle) messbar.

Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich in der prozentualen Foci-Verteilung (Abb. 4.19 D). In $5,0 \pm 1,0$ % der unbehandelten Zellen konnten γ H2AX-Foci detektiert werden sowie in $5,6 \pm 0,7$ % (7 T-B₀) und $4,9 \pm 0,8$ % (7 T-EPI) der Zellen 1 h nach Exposition am 7 T-MRT. Signifikante Unterschiede der γ H2AX-positiven Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung im CT-Scanner ($28,7 \pm 2,5$ %) und zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nach Gammabestrahlung mit 0,2 Gy (1 h: $80,3 \pm 2,7$ %) gemessen.

Zellen, die zuvor einer Bestrahlungsdosis von 30 Gy ausgesetzt waren, konnten nicht in die γ H2AX-Analyse integriert werden, da 1 h nach Bestrahlung $90,0 \pm 1,5$ % der Zellen eine pan-nukleäre γ H2AX-Färbung aufwiesen und nicht ausgewertet werden konnten.

Zytotoxizitätsanalysen

Zur Zytotoxizitätsuntersuchung wurden zum einen die Zellviabilität mithilfe des Cell-Titer-Blue-Tests und zum anderen die Zellproliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt.

Zellen, die mit 30 Gy bestrahlt wurden, zeigten bereits nach 24 h eine signifikante Reduktion der Zellviabilität auf $77,2 \pm 3,0$ % (Abb. 4.20 A). Mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung fiel die Zellviabilität der γ -bestrahlten Zellen dosisabhängig ab und betrug 84 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 30 Gy $56,6 \pm 2,9$ % und mit einer Dosis von 0,2 Gy $54,4 \pm 2,9$ % (Abb. 4.20 B, C). Bei den restlichen Proben konnten 84 h nach Exposition keine signifikanten Veränderungen der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (100 %) beobachtet werden. Sie betrug $102,4 \pm 2,7$ % (7 T-B₀), $101,7 \pm 3,1$ % (7 T-EPI) und $97,6 \pm 2,9$ % (CT).

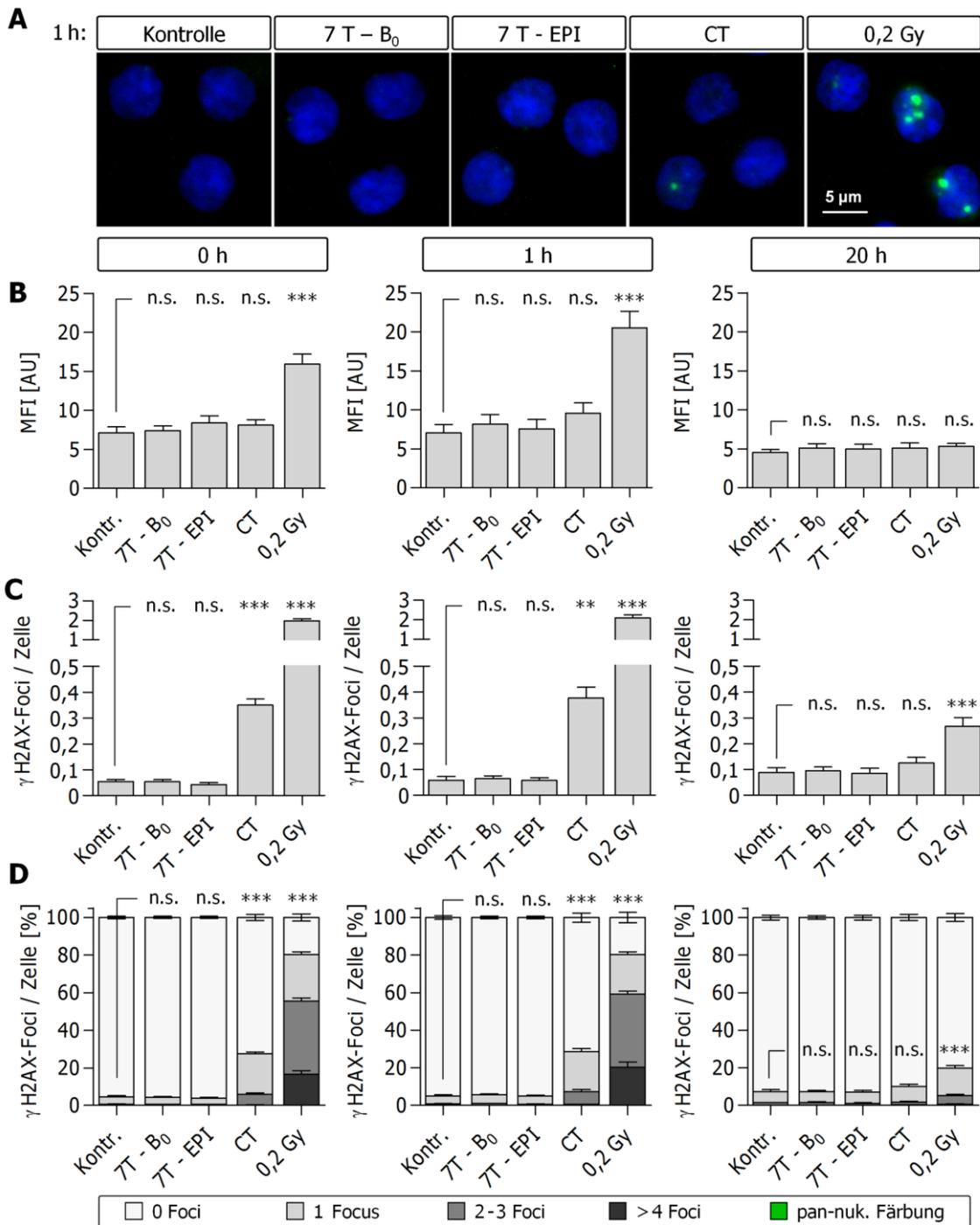


Abb. 4.19: Mikroskopische γ H2AX-Analyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht-ionisierender und ionisierender Strahlung

Analyse der γ H2AX-Foci in unstimulierten MNZ direkt (0 h) sowie 1 h und 20 h nach angegebener Exposition (unbehandelte Kontrolle; 7 T-MRT: nur B₀-Feld oder B₀-Feld+EPI; CT mit ~37,4 mGy Röntgenstrahlen; 0,2 Gy Gammastrahlen). **A)** Mikroskopbilder von DAPI- (blau) und γ H2AX-gefärbten (grün) Zellen eines repräsentativen Versuchs, aufgenommen 1 h nach angegebener Behandlung mittels automatisierter Mikroskopie. **B)** Mittlere γ H2AX-Intensität, **C)** mittlere Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle und **D)** prozentuale Foci-Verteilung zu den drei analysierten Zeitpunkten. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus je 16 unabhängigen Experimenten (***: P \leq 0,001; **: P \leq 0,01; n.s.: P > 0,05).

Für die Proliferationsanalyse erfolgte nach Exposition der MNZ eine Zellaktivierung durch PHA, wodurch sich die DNA-Synthese bei Kontrollproben von 497 ± 60 cpm (unstimuliert) auf 12.362 ± 1.055 cpm erhöhte. Nach 7 T-MRT-Exposition (7 T-B₀: 11.630 ± 962 cpm; 7 T-EPI: 10.967 ± 957 cpm) sowie nach Bestrahlung mit einer geringen Dosis ionisierender Strahlung (CT: 11.386 ± 941 ; 0,2 Gy: 12.924 ± 974 cpm) war die DNA-Synthese der Zellen nicht signifikant verändert. Nur nach Bestrahlung mit 30 Gy sank die Zellproliferation signifikant um 81 % auf 2.382 ± 159 cpm (Abb. 4.20 D).

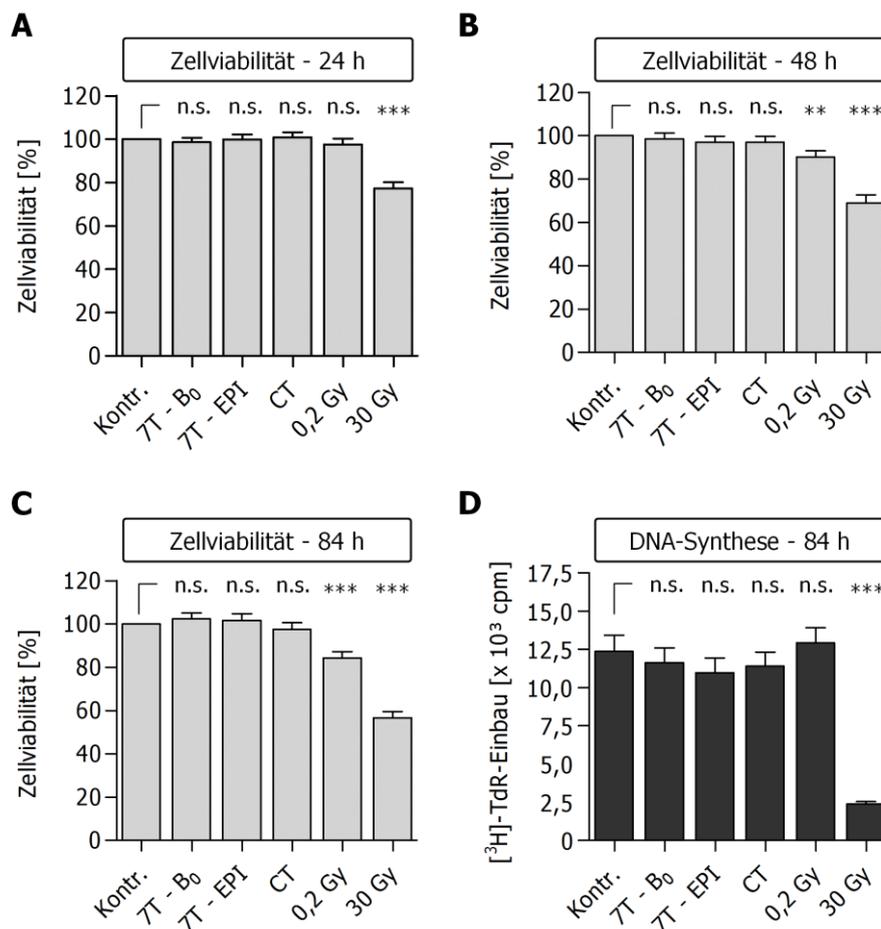


Abb. 4.20: Zytotoxizitätsanalyse nach In-vitro-Exposition von MNZ gegenüber nicht-ionisierender und ionisierender Strahlung

Bestimmung der Zellviabilität (graue Balken) mittels Cell-Titer-Blue-Test und des Proliferationsverhaltens (schwarze Balken) mittels [³H]-Thymidin-Einbau nach angegebener Exposition (unbehandelte Kontrolle; 7 T-MRT: nur B₀-Feld oder B₀-Feld+EPI; CT mit ~37,4 mGy Röntgenstrahlen; 0,2 Gy bzw. 30 Gy Gammastrahlen). **A)** Die Zellviabilität der unstimulierten MNZ wurde 24 h, **B)** 48 h und **C)** 84 h nach angegebener Exposition bestimmt. **D)** Zur Analyse des Proliferationsverhaltens wurden die Zellen nach Exposition mit PHA stimuliert und die DNA-Synthese nach 84 h gemessen. Dargestellt sind die MW \pm SEM aus je 16 unabhängigen Experimenten (***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; n.s.: $P > 0,05$).

4.7.2 Analysen zum Einfluss der statischen Magnetfeldstärke und des Kontrastmittels auf die Induktion von γ H2AX-Foci in MNZ von Patienten nach MRT-Untersuchung

In-vivo-Studie zur Analyse MRT-induzierter γ H2AX-Foci

In die folgende In-vivo-Studie wurden 53 Patienten aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg einbezogen, die dort eine routinemäßige MRT- bzw. CT-Untersuchung erhielten. Ihnen wurde jeweils vor dem Scan (t_1), 5 min nach dem Scan (t_2) und 30 min nach dem Scan (t_3) Blut entnommen und die Anzahl an γ H2AX-Foci in den daraus isolierten MNZ bestimmt. Anhand des genutzten Scanners und der Gabe von Kontrastmittel (KM) wurden MRT- und CT-Patienten in insgesamt neun Gruppen unterteilt. Eine Übersicht ist in Abb. 4.21 dargestellt. Angaben zur Energieabsorption bezüglich der angewendeten MRT-Protokolle und zu demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

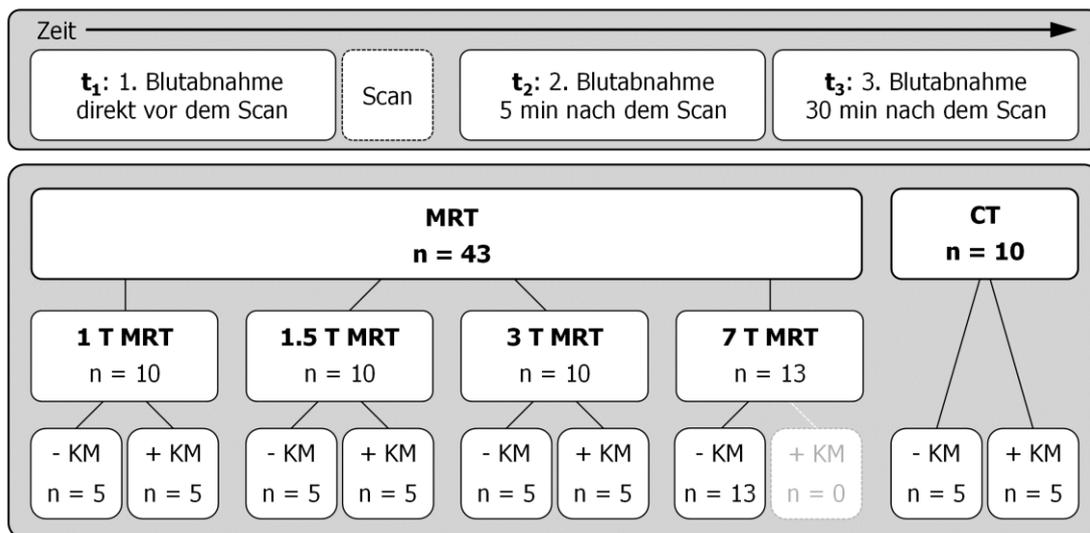


Abb. 4.21: Flussdiagramm zur Darstellung der Blutabnahmen und Klassifizierung der verschiedenen Untersuchungsbedingungen in der In-vivo-Studie

Oben: Den Patienten wurde direkt vor dem Scan (t_1) sowie 5 min (t_2) und 30 min (t_3) nach dem Scan Blut abgenommen. Insgesamt wurden 53 Patienten in die Studie integriert. Unten: Die Klassifizierung der Patienten beinhaltet das durchgeführte Bildgebungsverfahren (MRT, CT), die Feldstärke des verwendeten MRT-Scanners sowie die Injektion von Kontrastmittel (\pm KM).

Der mittlere Basalwert (t_1) an DSB aller 53 Patienten betrug $0,14 \pm 0,02$ γ H2AX-Foci/Zelle. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede ($P = 0,699$) zwischen Männern und Frauen beobachtet. Bezogen auf die gesamte MRT-Gruppe wurde ein Basalwert von $0,13 \pm 0,02$ Foci/Zelle ermittelt (Abb. 4.22 A). MNZ, die von Patienten 5 min und 30 min nach MRT-Scan isoliert wurden, wiesen keine signifikanten Veränderungen in der Menge quantifizierter γ H2AX-Foci/Zelle auf (t_2 : $0,12 \pm 0,02$ Foci/Zelle; t_3 : $0,11 \pm 0,02$ Foci/Zelle).

Anders als bei der MRT-Gruppe konnte bei Patienten nach CT-Untersuchung ein signifikanter Anstieg von $0,14 \pm 0,05$ γ H2AX-Foci/Zelle (t_1) auf $0,26 \pm 0,07$ Foci/Zelle (t_2) bzw. $0,24 \pm 0,07$ Foci/Zelle (t_3) gemessen werden (Abb. 4.22 A).

Im Gegensatz zu der vorherigen In-vitro-Studie, bei der ausschließlich MNZ von gesunden Blutspendern verwendet wurden, war innerhalb dieser In-vivo-Studie eine erhöhte Heterogenität der individuellen Basalwerte zu beobachten. Diese lagen zwischen minimal $0,01$ Foci/Zelle und maximal $0,58$ Foci/Zelle. Der Unterschied zwischen den individuellen γ H2AX-Werten führt innerhalb der Gruppen zu einer hohen Varianz der gemittelten Daten. Um die starke Streuung der Einzelwerte zu kompensieren und den relativen Anstieg zum Basalwert zu ermitteln, erfolgte in einem weiteren Schritt die Normalisierung der individuellen Daten bezüglich des entsprechenden Ausgangswerts ($t_1 = 1$). Dadurch konnte der Variationskoeffizient halbiert werden. Während sich die relativen Werte der MRT-Gruppe (t_2 : $0,94 \pm 0,07$; t_3 : $0,96 \pm 0,06$) nicht signifikant unterschieden, konnte für die CT-Gruppe zum Zeitpunkt t_2 ein signifikanter Anstieg um das $4,00 \pm 1,13$ -fach und zum Zeitpunkt t_3 um das $2,52 \pm 0,49$ -fach ermittelt werden (Abb. 4.22 B). Durch die Normalisierung vergrößerte sich die Differenz zwischen den γ H2AX-Werten vor und nach CT, im Vergleich zu den absoluten Daten.

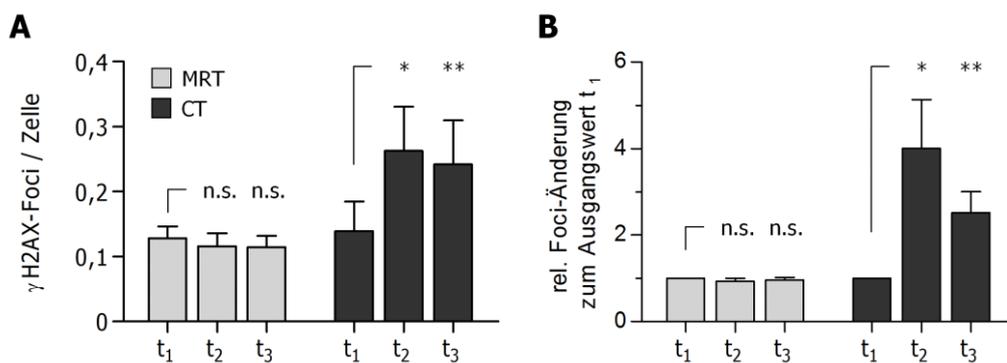


Abb. 4.22: In-vivo-Studie zur Analyse MRT-induzierter γ H2AX-Foci

Insgesamt wurde von 43 MRT- und 10 CT-Patienten unmittelbar vor der Untersuchung (t_1) sowie 5 min (t_2) und 30 min (t_3) nach dem Scan Blut abgenommen und in den daraus isolierten MNZ die Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle mikroskopisch am AKLIDES-System bestimmt. **A**) Dargestellt sind MW \pm SEM der γ H2AX-Foci/Zelle sowie **B**) die relative Veränderung bezogen auf den individuellen Ausgangswert zum Zeitpunkt $t_1 = 1$. (**: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

Bei den differenzierten Analysen der einzelnen MRT-Untergruppen, klassifiziert bezüglich der MRT-Feldstärke und der Gabe von Gadolinium-basiertem Kontrastmittel, konnten erneut keine Unterschiede zwischen den γ H2AX-Werten vor und nach MRT-Untersuchung beobachtet werden (Abb. 4.23). Im Vergleich zum nativen Hochfeld (1 T, 1,5 T, 3 T)-MRT (t_1 : $0,11 \pm 0,02$; t_2 : $0,10 \pm 0,02$; t_3 : $0,10 \pm 0,02$ Foci/Zelle) verursachte weder die Injektion von Kontrastmittel (t_1 : $0,15 \pm 0,04$; t_2 : $0,13 \pm 0,04$; t_3 : $0,13 \pm 0,04$ Foci/Zelle), noch die Untersuchung am 7 T-Ultrahochfeldscanner (t_1 : $0,12 \pm 0,04$; t_2 : $0,11 \pm 0,04$; t_3 : $0,11 \pm 0,04$ Foci/Zelle) eine signifikante Änderung der γ H2AX-Foci (Abb. 4.23 A, links).

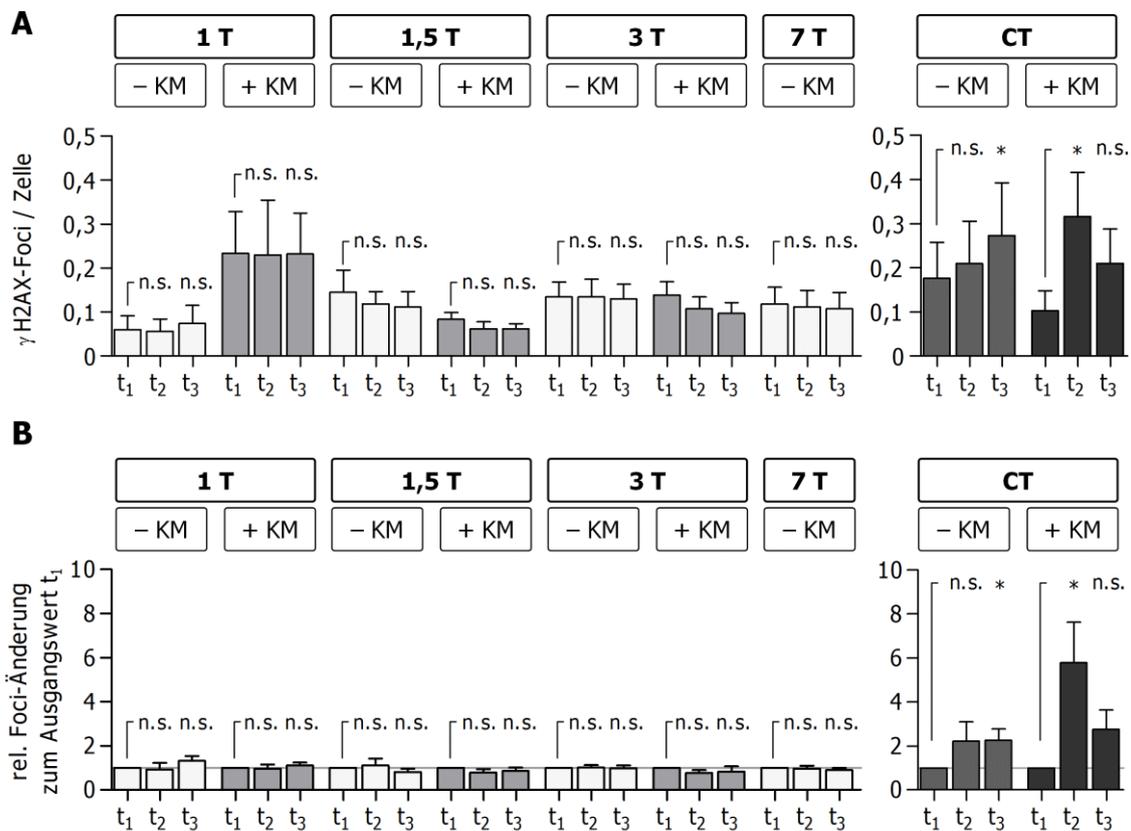


Abb. 4.23: In-vivo-Studie zur Analyse MRT-induzierter γ H2AX-Foci – Proben differenziert bezüglich der statischen Magnetfeldstärke und Injektion von Kontrastmittel
 Differenzierte Darstellung der in Abb. 4.22 gezeigten Daten. Die Gruppen wurden anhand der Feldstärke des MRT-Scanners (1 T; 1,5 T; 3 T und 7 T) und zusätzlich bezüglich der Gabe von Kontrastmittel (\pm KM) unterteilt. Die Ergebnisse der 7 T-MRT-Gruppe beruhen auf den Daten von 13 Patienten, die der restlichen Gruppen auf den Daten von jeweils 5 Patienten. **A**) Dargestellt sind MW \pm SEM der absoluten Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle sowie **B**) der relativen Veränderung bezogen auf den individuellen Ausgangswert zum Zeitpunkt $t_1 = 1$, (**: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

Bei der CT-Untergruppe, die ohne Kontrastmittel untersucht wurde, stieg die Anzahl an γ H2AX-Foci von $0,18 \pm 0,08$ Foci/Zelle (t_1) im Durchschnitt auf $0,21 \pm 0,10$ Foci/Zelle (t_2) bzw. auf $0,27 \pm 0,12$ Foci/Zelle (t_3 , $P \leq 0,05$) an. Nach CT in Kombination mit jodhaltigem Kontrastmittel erhöhte sich die Anzahl der γ H2AX-Foci von $0,10 \pm 0,05$ Foci/Zelle (t_1) auf $0,32 \pm 0,10$ Foci/Zelle (t_2 , $P \leq 0,05$) bzw. $0,21 \pm 0,08$ Foci/Zelle (t_3) (Abb. 4.23 A, rechts).

Bezogen auf den individuellen Ausgangswert zeigten Analysen der relativen γ H2AX-Daten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen innerhalb der MRT-Untergruppen. Hingegen stieg das relative γ H2AX-Niveau um den Faktor $2,22 \pm 0,88$ (t_2) bzw. $2,27 \pm 0,51$ (t_3 , $P \leq 0,05$) nach CT-Untersuchung ohne Kontrastmittel und um $5,79 \pm 1,83$ (t_2 , $P \leq 0,05$) bzw. $2,77 \pm 0,88$ (t_3) nach einer CT-Untersuchung mit jodhaltigem Kontrastmittel an.

Tabelle 4.2: Energieabsorption bei Anwendung unterschiedlicher MRT-Protokolle und demographische Patientendaten

Berechnete Ganzkörper-SAR, Expositionszeit (t_E) sowie standardisierte Energiedosis (SED, entspricht dem Produkt aus $SAR \times t_E$) der einzelnen MRT-Protokolle, sowie demographische Charakteristika der Patienten.

MRT		MRT- Protokoll	SAR [W/kg]	t_E [s]	SED [J/kg]	n ges.	n ♀	n ♂	Alter [Jahre \pm SD]
T	KM								
1	-	Schulter	0,4	2070	840	5	3	2	$32,8 \pm 11,7$
	+	Herz	0,3	605	193	5	3	2	$39,8 \pm 17,2$
1,5	-	Abdominal	1,4	755	1065	3			$44,2 \pm 11,9$
		Knie	2,1	1345	2808	1	5	0	
		Thorax	2,4	679	1149	1			
	+	LWS	2,6	1656	4379	1			$54,2 \pm 19,8$
		Lunge	2	679	1369	1	1	4	
		Pankreas	2	1409	2818	2			
		Becken	1,4	761	1027	1			
3	-	Knöchel	0,9	1439	1295	1			$45,0 \pm 8,9$
		HWS	1,3	2038	2726	1	3	2	
		Knie	1,1	1227	1350	3			
	+	LWS	1,3	1188	1511	1			$67,8 \pm 10,3$
		Becken	1,1	1673	1757	2	1	4	
		Prostata	1,2	1432	1718	1			
		Rektum	1,2	1861	2311	1			
7	-	Knie	0,2	1982	312	13	6	7	$43,2 \pm 13,5$

In-vitro-Analyse zur Toxizität des MRT-Kontrastmittels Gadovist®

In In-vitro-Untersuchungen mit MNZ gesunder Blutspender wurde getestet, ob das gadoliniumhaltige MRT-Kontrastmittel Gadovist® (Gd) allein toxisch auf Zellen wirkt. Zellen wurden dazu mit Konzentrationen von 0,01 bis 100 mM Gd inkubiert und anschließend γ H2AX-Foci, Zellproliferation und Zellviabilität analysiert. Die Behandlung der Zellen mit 10 μ M ETP diente als Positivkontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 24 h und 72 h konnte bei keiner der getesteten Gd-Konzentrationen eine signifikante Veränderung der durchschnittlichen Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle nachgewiesen werden (Abb. 4.24 A). Bei der Analyse des Proliferationsverhaltens PHA-stimulierter MNZ zeigte sich nach 72 h ebenfalls keine signifikante Beeinträchtigung durch Gd (Abb. 4.24 B). Nur mittels PI-Färbung konnte bei einer Dosis von 100 mM Gd nach 72-stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von $91,7 \pm 0,5$ % auf $86,6 \pm 1,4$ % ermittelt werden (Abb. 4.24 C).

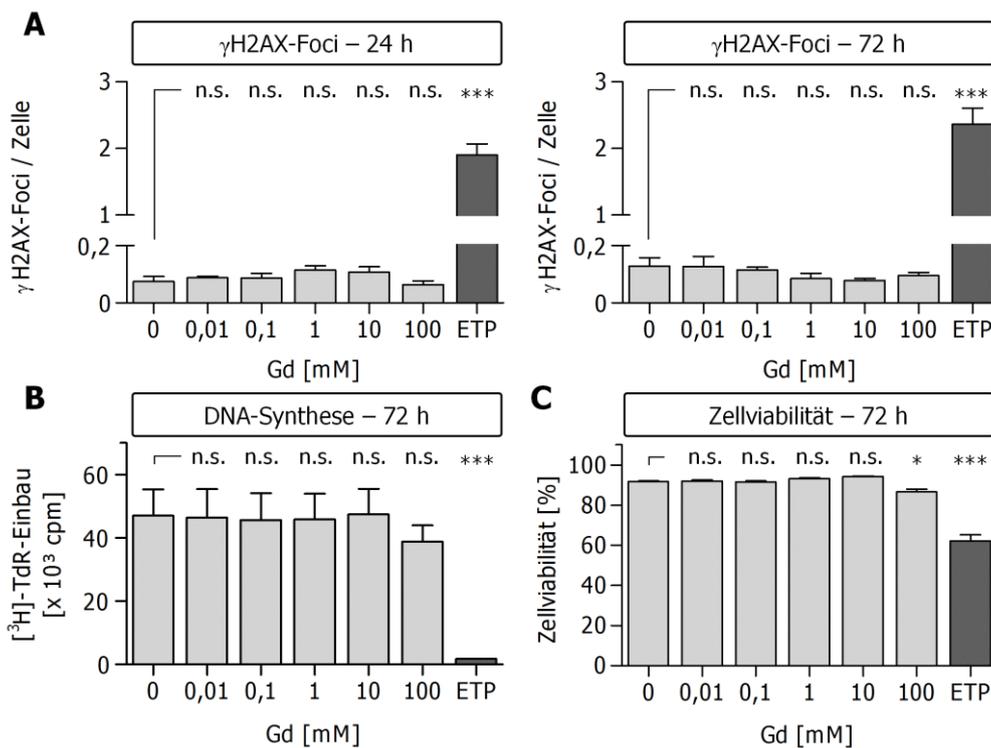


Abb. 4.24: In-vitro-Analyse zur Toxizität des Kontrastmittels Gadovist®

Isolierte MNZ gesunder Spender wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Gadovist® (Gd, hellgraue Balken) bzw. mit 10 μ M ETP (dunkelgraue Balken) inkubiert. **A**) Nach 24 h und 72 h wurde mikroskopisch die Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle bestimmt. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte die Messung **B**) der DNA-Synthese (PHA-Stimulation) und **C**) der Zellviabilität (unstimulierten MNZ; PI-Färbung). Dargestellt sind MW \pm SEM aus 4 Versuchen (***: $P \leq 0,001$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P > 0,05$).

4.7.3 Studie zur Untersuchung der DNA-Integrität in MNZ von Probanden mit erhöhter 7 T-MRT-Exposition

In der folgenden Studie sollte der Einfluss häufiger Exposition gegenüber 7 T-MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern auf die DNA-Integrität analysiert werden. In der exponierten Probandengruppe (EXP) wurden Männer (mittleres Alter: 34 ± 7 Jahre) untersucht, die als Versuchspersonen im Vorjahr durchschnittlich 65 h (max. 175 h) im 7 T-MRT exponiert wurden und aus beruflichen Gründen 0,5 – 6 h pro Woche am 7 T-Scanner arbeiteten (siehe Kapitel 3.3.2). Als Kontrollgruppe (KG) dienten gleichaltrige männliche Probanden (mittleres Alter: 33 ± 9 Jahre), die noch nie im Ultrahochfeldscanner exponiert worden waren und im Vorjahr zur Studie keine anderen MRT-Untersuchung erhielten (ein Proband der KG wurde 6 Monate vor Studienbeginn am 1,5 T-MRT untersucht). Von jeweils elf Blutspendern pro Gruppe wurden MNZ isoliert und die basale Anzahl an γ H2AX-Foci und Mikronuklei bestimmt. Darüber hinaus erfolgte analog zu den Versuchen in Kapitel 4.7.1 eine In-vitro-Exposition der unstimulierten MNZ am 7 T-MRT mit EPI-Sequenzen, welche die maximal zulässige Stärke der Gradienten- und Hochfrequenzfelder aufwiesen. Die Bestrahlung mit 0,2 Gy diente als Positivkontrolle.

Um zusätzlich den Einfluss der 7 T-MRT in Kombination mit Zytostatikabehandlung sowie die anschließende DNA-Reparaturkinetik zu untersuchen, wurden Proben von beiden Gruppen mit 10 μ M ETP behandelt und jeweils eine Probe außerhalb und eine Probe innerhalb des 7 T-MR-Scanners zusammen mit EPI-Sequenzen für 1 h bei 22°C inkubiert. Zur weiteren Phosphorylierung von γ H2AX wurden alle Proben im Anschluss für eine Stunde im Inkubator platziert und danach die initiale Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt. Zur Analyse der Reparaturkinetik wurde das ETP ausgewaschen und die γ H2AX-Foci nach 1 h, 4 h und 20 h für alle vier Bedingungen (EXP: ETP \pm 7 T-MRT; KG: ETP \pm 7 T-MRT) bestimmt.

γ H2AX-Analyse

Anhand des basalen γ H2AX-Niveaus konnten zwischen EXP ($0,10 \pm 0,01$ Foci/Zelle; $7,8 \pm 1,0$ % γ H2AX-positive Zellen) und KG ($0,09 \pm 0,02$ Foci/Zelle; $7,6 \pm 1,5$ % γ H2AX-positive Zellen) keine Unterschiede ermittelt werden (Abb. 4.25). Auch die zusätzliche In-vitro-Exposition im 7 T-MRT induzierte keine signifikanten Veränderungen im γ H2AX-Niveau beider Gruppen (7 T-MRT: EXP $0,08 \pm 0,01$ Foci/Zelle; KG $0,09 \pm 0,02$ Foci/Zelle) Messungen nach 20 h und 72 h wiesen ebenfalls keine Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu führte eine Gammabestrahlung mit 0,2 Gy sowohl in MNZ der EXP ($2,01 \pm 0,17$ Foci/Zelle) also auch in der KG ($1,92 \pm 0,16$ Foci/Zelle) zu einem 20-fachen Anstieg der γ H2AX-Foci. Wie die Daten nach 20 h und 72 h zeigen, erfolgte die Reparatur der Foci gleichermaßen in EXP und KG. Drei Tage nach Bestrahlung konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an γ H2AX-Foci zwischen den Proben gemessen werden (Abb. 4.25 A, B – 72 h).

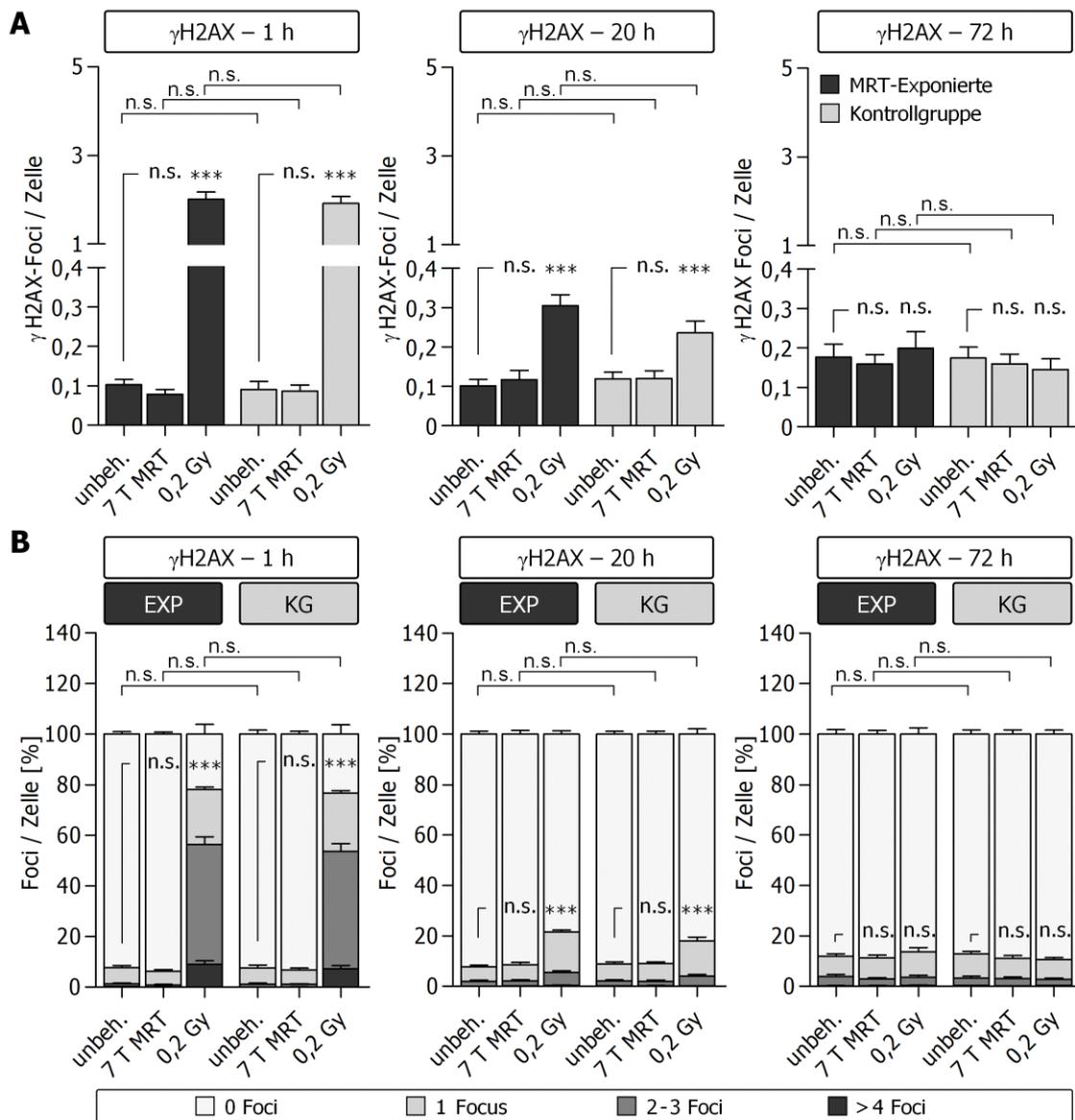


Abb. 4.25: Analyse der γ H2AX-Foci in MNZ von Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assozierten elektromagnetischen Feldern

Bei 11 Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assozierten elektromagnetischen Feldern (MRT-Exponierte, EXP, schwarze Balken) sowie bei 11 Blutspendern der Kontrollgruppe (KG, graue Balken) wurden MNZ isoliert. Diese blieben unbehandelt oder wurden *in vitro* in einem 7 T-MRT+EPI exponiert bzw. mit 0,2 Gy bestrahlt. **A)** Die Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle sowie **B)** die prozentuale Verteilung der γ H2AX-Foci wurde zu drei Zeitpunkten (1 h, 20 h, 72 h) nach Exposition bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM aus 11 unabhängigen Versuchen (***: $P \leq 0,001$; n.s.: $P > 0,05$).

Mikronuklei-Analyse

In den MNZ wurden 72 h nach Exposition die Mikronuklei bestimmt. Wie in Abb. 4.26 A dargestellt, unterschied sich die Anzahl spontaner Mikronuklei nach Auswertung von jeweils 2.000 binukleären Zellen pro Probe nicht signifikant zwischen beiden Probandengruppen (unbehandelt: EXP $14,4 \pm 0,6$ MN; KG $13,8 \pm 0,6$ MN). Nach zusätzlicher In-vitro-7 T-MRT-Exposition war ebenfalls keine signifikante Veränderung in der MN-Anzahl zu beobachten (7 T-MRT: EXP $14,6 \pm 0,6$ MN; KG $14,1 \pm 0,7$ MN). Im Gegensatz dazu konnte nach Bestrahlung mit 0,2 Gy ein signifikanter Anstieg an MN gleichermaßen für beide Gruppen verzeichnet werden (0,2 Gy: EXP $22,9 \pm 1,2$ MN; KG $22,2 \pm 1,3$ MN).

Bei der Analyse der Zellproliferation lag der ermittelte prozentuale Anteil an binukleären Zellen für unbehandelte Zellen bei $56,3 \pm 0,7\%$ (EXP) bzw. $57,0 \pm 0,6\%$ (KG) und veränderte sich nicht signifikant nach 7 T-MRT (EXP $60,0 \pm 0,9\%$; KG $57,6 \pm 0,7\%$). In beiden Gruppen reduzierte sich der prozentuale Anteil binukleärer Zellen signifikant nach Gammabestrahlung (EXP $47,1 \pm 0,9\%$; KG $46,1 \pm 0,9\%$) (Abb. 4.26 B). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Bestimmung des Proliferationsindex. Während sich dieser nicht zwischen den unbehandelten (EXP $1,68 \pm 0,01$; KG $1,72 \pm 0,01$) und 7 T-MRT-exponierten Zellen (EXP $1,65 \pm 0,01$; KG $1,68 \pm 0,02$) unterschied, sank der Proliferationsindex signifikant bei bestrahlten MNZ (EXP $1,49 \pm 0,01$; KG $1,48 \pm 0,01$) ab (Abb. 4.26 C).

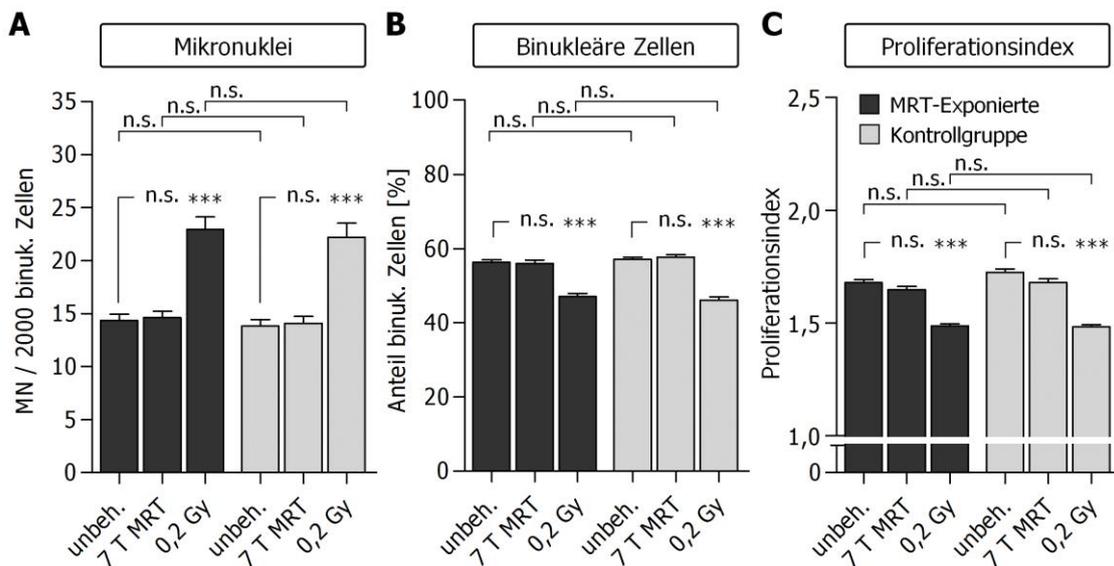


Abb. 4.26: Analyse der Mikronuklei und Proliferation in MNZ von Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern

Bei 11 Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern (schwarze Balken) sowie bei 11 Blutspendern der Kontrollgruppe (graue Balken) wurden MNZ isoliert. Diese blieben unbehandelt oder wurden *in vitro* in einem 7 T-MRT+EPI exponiert bzw. mit 0,2 Gy bestrahlt. Nach anschließender 72-stündiger PHA-Stimulation wurde von den Proben **A)** die Anzahl der Mikronuklei (MN) in jeweils 2000 binukleären Zellen pro Probe sowie **B)** der Anteil binukleärer Zellen und **C)** der Proliferationsindex bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM aus 11 unabhängigen Versuchen (***: $P \leq 0,001$; n.s.: $P > 0,05$).

Analysen der induzierten γ H2AX-Foci und der DSB-Reparatur nach Ko-Exposition ETP-behandelter MNZ im 7 T-MRT

Nach Zugabe von 10 μ M ETP erhöhte sich die Anzahl an γ H2AX-Foci in den MNZ beider Probandengruppen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der alleinigen ETP-Behandlung und der Ko-Exposition im 7 T-MRT sowie zwischen der Gruppe häufig exponierter Probanden (ETP: $2,80 \pm 1,23$ Foci/Zelle; ETP + 7 T-MRT: $2,87 \pm 1,14$ Foci pro Zelle) und der Kontrollgruppe (ETP: $2,54 \pm 1,26$ Foci/Zelle; ETP + 7 T-MRT: $2,60 \pm 1,27$ Foci/Zelle) ermittelt (Abb. 4.27). Nach Entfernen von ETP konnten in der Reparaturkinetik ebenfalls weder signifikante Unterschiede zwischen einzel- und ko-exponierten MNZ, noch zwischen beiden Probandengruppen detektiert werden. Alle Proben wiesen innerhalb der ersten 4 h nach ETP-Entfernung eine starke Reduktion der γ H2AX-Foci auf. Dennoch war auch 20 h nach Exposition der Anteil residueller γ H2AX-Foci, im Vergleich zu unbehandelten MNZ, bei allen ETP-exponierten Proben signifikant erhöht.

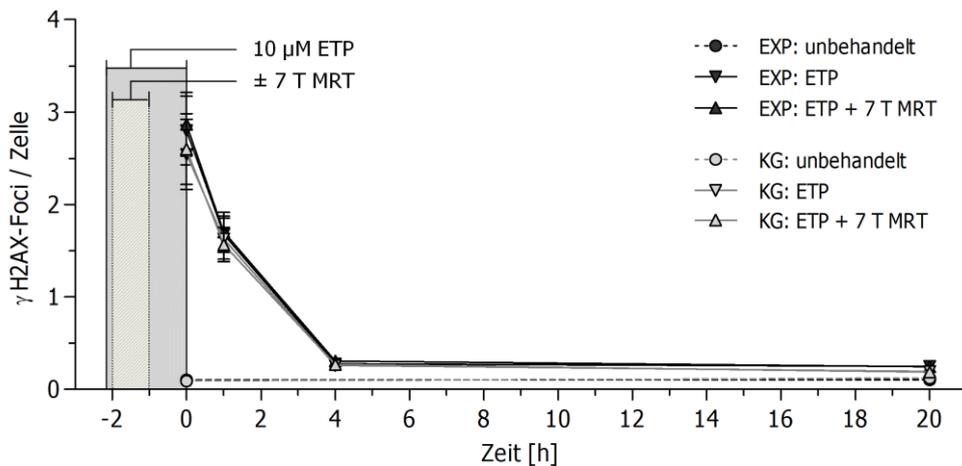


Abb. 4.27: Einfluss der 7 T-MRT auf γ H2AX-Foci in ETP-behandelten MNZ und deren Reparaturkinetik in MRT-exponierten Probanden und Kontrollgruppe

Bei 11 Probanden mit erhöhter Exposition gegenüber MRT-assoziierten elektromagnetischen Feldern (EXP) sowie bei 11 Blutspendern der Kontrollgruppe (KG) wurden MNZ isoliert und zu den Proben ca. 15 min vor MRT-Exposition 10 μ M ETP gegeben (dargestellt als graues Rechteck). Die ETP-haltigen Proben wurden anschließend für 1 h im 7 T-MRT exponiert oder außerhalb des MRT gelagert (Zeitraum dargestellt durch schraffiertes Feld). Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Proben bei 37°C, bevor ETP über zwei Waschstufen aus den Proben entfernt wurde (Zeitpunkt 0 h). Die ermittelte Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle ist als MW \pm SEM von jeweils 11 unabhängigen Versuchen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Evaluierung der automatisierten γ H2AX-Analyse

Im Jahr 1998 beschrieb die Arbeitsgruppe um William Bonner nach Gammabestrahlung der humanen Glioblastom-Zelllinie SF268 erstmals die spezifische Phosphorylierung von Serin-139 des H2AX-Moleküls als Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen [73]. Im darauffolgenden Jahr konnte diese Arbeitsgruppe am Fluoreszenzmikroskop γ H2AX immunzytochemisch als punktförmige Strukturen im Zellkern nachweisen [71]. Die Vielzahl potentieller Anwendungen, die einfache Umsetzung und hohe Sensitivität dieser Nachweismethode im Zusammenhang mit der kommerziellen Verfügbarkeit spezifischer poly- und monoklonaler Antikörper führten in der Folge zu einer weiten Verbreitung des γ H2AX-Assays. Basierend auf den Angaben der Meta-Datenbank Pubmed erschienen allein im Jahr 2015 mehr als 500 Publikationen zum Suchbegriff γ H2AX [150].

Die sensitivste und verbreitetste Methode zur γ H2AX-Bestimmung ist die Durchführung eines indirekten Immunfluoreszenztests mit anschließender Quantifizierung der γ H2AX-Foci am Fluoreszenzmikroskop [72,77,151]. Dabei ist die visuelle Auszählung der Foci sehr zeitaufwendig und anfällig für subjektive Einflüsse [99,100]. Studien haben gezeigt, dass manuell erhobene Daten insbesondere zwischen verschiedenen Laboren hohe Varianzen aufwiesen [109,152]. Um die Auswertung der Foci zu standardisieren und zu beschleunigen, wurden in den letzten 15 Jahren verschiedene Verfahren zur automatisierten Foci-Quantifizierung entwickelt [99,101–111].

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die Eignung der digitalen Mikroskopieplattform AKLIDES für die Analyse des γ H2AX-Immunfluoreszenztests untersucht werden. Das AKLIDES-System wurde ursprünglich zur automatisierten Auswertung von Immunfluoreszenzmustern in der Autoantikörperdiagnostik konstruiert und später u. a. für die Analyse von partikel-basierten Multiparametertests sowie von γ H2AX-Foci erweitert [109,146,153–155]. Das langfristige Ziel besteht darin, dieses Gerätesystem für die standardisierte und kostengünstige Hochdurchsatzanalyse von Immunfluoreszenztests in der Routinelabordiagnostik einzusetzen. Für die diagnostische Bestimmung von Autoantikörpern wurde die AKLIDES-Plattform in Kombination mit den dazugehörigen Testsystemen bereits zertifiziert. Die γ H2AX-Analyse ist indes derzeit nur für Forschungszwecke zugelassen.

Um die automatisierte γ H2AX-Analyse des AKLIDES-Systems zu charakterisieren, erfolgte im Rahmen dieser Promotionsarbeit zuerst die Validierung dieses Verfahrens. Als Zellsystem dienten frisch isolierte humane MNZ, in denen durch Inkubation mit dem Zytostatikum Etoposid γ H2AX-Foci induziert wurden.

Die Vergleichsanalyse zwischen manueller und automatisierter γ H2AX-Foci-Quantifizierung verdeutlichte eine gute Übereinstimmung zwischen den Bildaufnahmen und den quantifizierten γ H2AX-Foci beider Datensätze. Der ermittelte Basalwert an DNA-DSB in MNZ gesunder Blutspender betrug nach automatisierter Auswertung $0,06 \pm 0,02$ Foci/Zelle und entsprach den Angaben anderer Publikationen [156–159]. Des Weiteren konnte in MNZ nach 16-stündiger Inkubation mit ETP im Konzentrationsintervall von 1,25 – 20 μ M eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Zytostatikumkonzentration und γ H2AX gezeigt werden. Hierbei wurden Unterschiede zwischen der γ H2AX-Foci-Quantifizierung und der γ H2AX-Intensitätsanalyse deutlich. Im Gegensatz zur γ H2AX-Intensität der Zellnuklei, welche im gesamten Konzentrationsbereich linear zur ETP-Dosis verlief, flachte die Kurve der quantifizierten γ H2AX-Foci mit zunehmender ETP-Konzentration ab. Dieser Effekt ist insbesondere auf die Überlagerung der Foci und Bildung von γ H2AX-Cluster zurückzuführen. Während unbehandelte Zellen keine Cluster aufwiesen, stieg die Anzahl der Cluster pro Zelle mit zunehmender ETP-Konzentration linear an, sodass bei einer ETP-Dosis von 20 μ M jede Zelle im Durchschnitt einen Cluster enthielt. Eine Zunahme überlappender Foci mit steigender Anzahl an DNA-DSB wurde auch von anderen Autoren beobachtet und als Ursache für eine Unterbewertung der quantifizierten γ H2AX-Foci beschrieben [71,102].

Um bei der Auszählung einen Fehler durch fusionierte Foci zu korrigieren, enthielt die γ H2AX-Analysesoftware des AKLIDES-Systems einen zusätzlichen Algorithmus. Dieser ermittelte anhand der zuvor definierten mittleren Focus-Größe und der gemessenen Clusterfläche die Foci-Anzahl, die der jeweilige Cluster theoretisch umfasst. Wie die durchgeführten Untersuchungen zeigten, konnte durch die zusätzliche Clusterauswertung der lineare Quantifizierungsbereich der γ H2AX-Foci erweitert werden. Um zu verhindern, dass pan-nukleär gefärbte oder stark beschädigte Zellen ebenfalls mithilfe dieses Algorithmus ausgewertet werden, wurde empirisch festgelegt, dass nur Zellen, die eine γ H2AX-Kernfärbung von weniger als 70 % aufweisen, in die DSB-Quantifizierung integriert werden. Überschritten Zellen diesen definierten Grenzwert, wurden sie als pan-nukleäre Zelle klassifiziert.

Andere Softwareprogramme nutzen zur Auswertung von überlappenden Foci z. B. die Wasserscheidentransformation, wodurch eine Segmentierung der Objekte erfolgt [99,102,111]. Diese ist im AKLIDES-System für die γ H2AX-Analyse nicht implementiert, wird aber im Rahmen der automatisierten Nuklei-Erfassung genutzt.

Neben Analysen zum Dosis-Wirkungsverhalten wurde in einer Zwölfachbestimmung die Präzision der automatisierten γ H2AX-Immunfluoreszenzmikroskopie in Abhängigkeit von der erfassten Zellzahl bei drei verschiedenen ETP-Konzentrationen (0 μ M, 1 μ M, 10 μ M) untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass die Präzision der Methode nicht nur von der Anzahl der analysierten Zellen, sondern auch von der Anzahl detektierter Foci abhängt. Bei einer quantitativen Erfassung von 50 Zellen pro Probe betrug die Gesamtzahl an γ H2AX-Foci bei unbehandelten MNZ durchschnittlich 7 DSB mit einem Variationskoeffizienten von 37,1 %. Nach Vervierfachung der Zellzahl auf 200 Zellen wurden durchschnittlich 27 DSB erfasst und der Variationskoeffizient sank auf 19,9 %. Im Vergleich konnten nach Behandlung mit 10 μ M ETP und der Steigerung der γ H2AX-Foci bei gleicher Zellzahl eine deutliche Verringerung des Variationskoeffizienten beobachtet werden (50 Zellen – VK: 9,5 %; 200 Zellen – VK: 5,1 %).

In einer Studie von Valente et al. wurde ebenfalls der Einfluss der Zellzahl auf die Varianz der ermittelten γ H2AX-Foci untersucht [160]. Die Auswertung erfolgte von je 1.500 unbehandelten und mit 0,2 Gy bestrahlten Lymphozyten mithilfe einer Bildanalysesoftware (Cellprofiler). In 100 Durchläufen wurden je 25, 50, 100, 250 oder 500 Zellen analysiert und die Ergebnisse gegenübergestellt. Analog zu den eigenen Daten konnte bei Erfassung derselben Zellzahl bei bestrahlten Proben, d. h. bei einer höheren Focuzahl pro Nukleus, ein geringerer VK bestimmt werden als bei unbehandelten Zellen. Dieser sank zudem mit steigender Anzahl an quantifizierten Zellen pro Probe. Während jedoch bei der eigenen 12-fach-Bestimmung eine Auswertung von je 12 separaten Proben bzw. Datensätze erfolgte, wurde bei der Untersuchung von Valente et al. auf denselben Datensatz mit 1.500 Zellen zurückgegriffen [160]. Bei einer Quantifizierung von 500 Zellen pro Durchlauf und einer Anzahl von 100 Durchläufen wurden von den 1500 Zellen des Datensatzes dieselben Zellen vielfach in die Analyse einbezogen, sodass die Varianzanalyse nicht als unabhängig betrachtet werden kann.

Die Daten der eigenen Analyse und von Valente et al. zeigten, dass zur Steigerung der Messgenauigkeit nicht nur eine minimale Anzahl an Zellen, sondern darüber hinaus auch eine minimale Anzahl an Foci erfasst werden sollten [160]. In der AKLIDES-Softwareversion, welche für die Erstellung dieser Arbeit genutzt wurde, war diese Bedingung der minimalen Foci-Anzahl noch nicht enthalten. Diese sollte in zukünftigen Versionen unbedingt mit implementiert werden. Während im veröffentlichten Protokoll zur γ H2AX-Analyse und den Studien der Arbeitsgruppe von W. Bonner bzw. C. Redon, welche erstmals die Quantifizierung fluoreszierender γ H2AX-Foci beschrieb, Foci in 50 – 100 bzw. 50 – 200 Nuklei ausgewertet wurden [91,161–163], erfolgte in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um M. Löbrich eine Quantifizierung von mindestens 40 Zellen (bei höherer γ H2AX-Konzentration) oder mindestens 40 Foci (bei geringem γ H2AX-Level) pro Probe [31,164–166].

Der Immunfluoreszenztest in Kombination mit der mikroskopischen Foci-Quantifizierung ist als sensitivste Methode zur γ H2AX-Bestimmung beschrieben [91,97,98,167]. Um dies zu analysieren und eine Gegenüberstellung der automatisierten Fluoreszenzmikroskopie mit der γ H2AX-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot zu ermöglichen, wurde ein direkter Vergleich dieser Methoden vorgenommen.

Anhand einer ETP-Verdünnungsreihe wurde die geringste ETP-Konzentration ermittelt, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen Anstieg der γ H2AX-Expression im jeweiligen Analyseverfahren hervorrief. Die Nachweisgrenze ließ sich aus der Summe des durchschnittlichen γ H2AX-Niveaus und der dreifachen Standardabweichung der unbehandelten Proben bestimmen [148]. Sie betrug nach Interpolation in den Versuchen für die automatisierte Foci-Quantifizierung $0,53 \mu\text{M}$ ETP. Eine mehr als 10-fach höhere ETP-Konzentration war nötig, um mittels mikroskopischer bzw. durchflusszytometrischer Intensitätsbestimmung einen Anstieg des γ H2AX-Niveaus im Vergleich zu unbehandelten MNZ nachzuweisen. Die geringste Sensitivität zeigte die γ H2AX-Bestimmung mithilfe des Western-Blot-Verfahrens. Die Resultate des Methodenvergleichs demonstrierten eindeutig, dass die γ H2AX-Foci-Quantifizierung von Immunfluoreszenzaufnahmen auch bei der automatisierten Bildanalyse das sensitivste Verfahren darstellte.

Darüber hinaus weisen die Ergebnisse dieser direkten Vergleichsuntersuchung auf den Vorteil der zusätzlichen Intensitätsanalyse hin. Diese eignet sich insbesondere bei Proben mit einem hohen Anteil an γ H2AX-Foci, bei denen die einzelnen DSB nicht mehr separat erfasst werden können [167]. Bei der Intensitätsmessung konnten im analysierten ETP-Konzentrationsintervall alle Proben quantifiziert werden, allerdings ging die Dosis-Wirkungskurve der Intensitätsanalyse von einem linearen Anstieg bei hohen Konzentrationen in ein Plateau über und die Intensität der Zellnuklei näherte sich einer Sättigung an.

Neben der hohen Sensitivität zeichnet sich die digitale γ H2AX-Mikroskopie durch die Erfassung zusätzlicher Parameter aus. Focusintensität, Focusgröße oder Focusform variieren je nach Art der Schadensinduktion. Watters et al. beobachteten in embryonalen Mausfibroblasten (MEF) diffuse γ H2AX-Foci nach Etoposid-Exposition, hellere schärfere Foci nach Behandlung mit Bleomycin und schwache, schwer zu quantifizierende γ H2AX-Strukturen nach Behandlung mit der alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat [168]. Trotz der Unterschiede werden diese morphologischen Parameter nur selten in γ H2AX-Untersuchungen berücksichtigt. Einen häufig genutzten Vorteil der mikroskopischen Auswertung bietet die Ko-Lokalisations-Analyse. Darüber wird ein direkter Vergleich der γ H2AX-Foci mit der Akkumulation anderer DNA-Reparaturmarker oder die Lokalisation der Schäden innerhalb unterschiedlicher Chromatinbereiche gewährt [169–173]. Des Weiteren können in histologischen Analysen von Gewebeschnitten, z. B. aus Biopsien, Strukturen mit

γ H2AX-positiven Zellen identifiziert oder einzelne γ H2AX-Foci quantifiziert werden [161,174,175]. Verschiedene Studien demonstrierten darüber hinaus die mikroskopische Analyse von γ H2AX- oder 53BP1-Foci mittels Videomikroskopie in lebenden Zellen. Hierfür wurden entweder fluoreszenzmarkierte Antikörperfragmente (Nanobodies) verwendet, ein binäres H2AX/MDC1-Luciferase Reportersystem genutzt oder die Dynamik der Reparaturfoci mithilfe transfizierter Zellen visualisiert, die fluoreszierendes 53BP1 exprimierten [176–179].

Im Vergleich zur Mikroskopie ist die Durchflusszytometrie insbesondere für die Auswertung von Proben mit mehr als einem Focus pro Zelle geeignet [91]. Zusätzlich kann am Durchflusszytometer über die angelegte Spannung der Photomultiplier die Signalstärke und darüber der Detektionsbereich der Proben innerhalb eines gewissen Intervalls angepasst werden.

Die γ H2AX-Analysen beruhen in dieser Arbeit auf den Signalen der Alexa-Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper. Im Vergleich zu traditionellen Fluorophoren, wie Fluorescein oder Rhodamin, wurden in den letzten Jahren z. B. von BD Biosciences sehr viel hellere Polymer-Farbstoffe (BD Horizon Brilliant polymer dyes) entwickelt, welche die Detektion besonders schwacher Signale verbessern sollen [180,181]. Zukünftig wäre zu prüfen, inwiefern die Nachweisgrenze der γ H2AX-Intensitätsanalyse durch die Verwendung dieser Fluorophore weiter herabgesetzt werden kann.

Darüber hinaus bietet die Durchflusszytometrie den Vorteil, durch Kombination, z. B. mit DNA-Farbstoffen wie PI, Zellen gemäß der verschiedenen Zellzyklusstadien zu markieren und zu klassifizieren [182]. Eine derartige Differenzierung ist bei Analysen von proliferierenden Zellen relevant, da diese abhängig von der Zellzyklusphase unterschiedliche γ H2AX-Niveaus aufweisen [183,184]. Weitere Antikörperfärbungen von Apoptosemarkern oder von spezifischen Oberflächenmolekülen würden die Identifizierung verschiedener Zellsubpopulationen ermöglichen.

Multiple Immunfluoreszenzfärbungen können unter Verwendung notwendiger Hardwaremodule, wie Filter oder Laser, auch auf die mikroskopische Analyse, z. B. mit dem AKLIDES-System, übertragen werden. In der Publikation von Hernández et al. nutzten die Autoren ein mikroskopisches Verfahren zur automatisierten γ H2AX-Quantifizierung in Kombination mit Zellzyklusanalysen [108]. Zu berücksichtigen ist bei der Fluoreszenzmikroskopie die unterschiedliche Geschwindigkeit in der Zellerfassung. Der Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, innerhalb von Sekunden mehrere Tausend Zellen detektieren zu können und folglich auch kleine Subpopulationen schnell zu analysieren. Andererseits kann bei der Durchflusszytometrie, im Gegensatz zur mikroskopischen γ H2AX-Focus-Analyse, die Hintergrundfluoreszenz nicht von der Foci-Intensität getrennt werden, sodass Effekte, die z. B. die Autofluoreszenz der Zellen oder die unspezifische Bindung von Sekundärantikörpern

betreffen, auch im γ H2AX-Signal widergespiegelt werden [97]. In eigenen Versuchen wurde eine Reduktion der Autofluoreszenz in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer beobachtet. Zur Bestimmung des unspezifischen Fluoreszenzsignals sollten daher z. B. bei Kinetikanalysen oder bei Vergleichen zwischen Probanden jeweils die entsprechenden Isotopkontrollen mitgeführt werden.

Neben der Fluoreszenzmikroskopie und der klassischen Durchflusszytometrie werden Eigenschaften beider Verfahren in der digitalen Bild-Zytometrie sowie bei der bildgebenden Durchflusszytometrie kombiniert [185,186]. Die Verbindung der Fluoreszenzmikroskope mit digitalen Kameras ermöglicht bei der digitalen Bild-Zytometrie die anschließende Analyse der generierten Mikroskopaufnahmen. Studien zeigten die Durchführung der γ H2AX-Analyse in Verbindung mit der Zellzyklusbestimmung und der anschließenden Datenauswertung in Form von Punktwolkendiagrammen, analog zur Durchflusszytometrie [187,188]. Die γ H2AX-Analyse mittels bildgebender Durchflusszytometrie ermöglichte neben der durchflusszytometrischen Intensitätsbestimmung die Bildaufnahme der einzelnen Zellen und darüber die Erfassung zusätzlicher Parameter, z. B. die Focus-Anzahl [189,190]. In einer Studie von Parris et al. wurde die Zahl der γ H2AX-Foci mithilfe der bildgebenden Zytometrie von 5.000 – 10.000 Zellen pro Probe bestimmt [190].

Im Gegensatz zu den einzelzellbasierten Immunfluoreszenztests eignet sich das Western-Blot-Verfahren weniger gut für quantitative Analysen in der Routinediagnostik, sondern dient vor allem experimentellen Ansätzen, bei denen mehr als ein DNA-DSB pro Zelle induziert werden. Wie der Vergleich der Nachweisgrenzen zwischen den unterschiedlichen Methoden verdeutlichte, zeigte dieses Verfahren die geringste Sensitivität bei der γ H2AX-Detektion. Da hierbei die γ H2AX-Konzentration aus dem Lysat der gesamten Probe bestimmt wird, können zudem weder unterschiedliche Subpopulationen noch apoptotische Zellen mit pan-nukleärer γ H2AX-Färbung differenziert werden. Das in dieser Arbeit angewandte chemilumineszenzbasierte Nachweisverfahren führte zudem zur Sättigung des Signals in Proben, die zuvor mit einer Konzentration von $\geq 100 \mu\text{M}$ ETP behandelt wurden. Bei geringeren Belichtungszeiten konnte hingegen die Bande der unbehandelten Kontrolle nicht detektiert werden. Zukünftig wäre für dieses Verfahren zu untersuchen, inwiefern der lineare Quantifizierungsbereich für die γ H2AX-Analyse durch Substitution der enzym-gekoppelten Sekundärantikörper mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern – in Kombination mit einer digitalen Fluoreszenzmessung – erweitert werden kann [191]. Einen Vorteil des Western-Blots im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung stellt die Lagerung der Lysate dar, wodurch eine zeitversetzte Analyse und die nachträgliche Erfassung zusätzlicher Proteine ermöglicht werden.

Wie der Vergleich verdeutlicht, weisen die verschiedenen γ H2AX-Methoden unterschiedliche Vor- und Nachteile auf. Die Wahl des idealen Verfahrens ist daher abhängig von den zu untersuchenden Proben und der zu klärenden Fragestellung zu treffen.

Neben der vollautomatisierten γ H2AX-Analyse am AKLIDES-System wurden innerhalb der letzten 15 Jahre auch andere Softwarelösungen zur automatisierten Focus-Quantifizierung beschrieben [99,101–111]. Die meisten Anwendungen umfassen Softwareprogramme zur digitalen Bildanalyse, welche die γ H2AX-Foci in zuvor separat erstellten Immunfluoreszenzaufnahmen auswerten. Während einige Programme nur eine semi-automatische Auswertung ermöglichen (z. B. Histolab [100,160], FociCounter [106]), bei welcher die Anwesenheit eines Benutzers zur Auswahl der einzelnen Zellkerne oder zum Laden der nachfolgenden Bilder notwendig ist, erkennen andere Programme anhand von zuvor definierten Parametern die Zellkerne selbstständig und können kontinuierlich eine Vielzahl hinterlegter Bilder auswerten (z. B. Cellprofiler [160], TGI [99], Focinator [110], FoCo [111]). Die jeweilige Software arbeitet dabei entweder alleinstehend (FociCounter [106]) oder wird als zusätzliche Applikation innerhalb bereits existierender Programme angewandt, wie Matlab [111,192] oder insbesondere ImageJ [102,103,107,110]. Darüber hinaus sind einige Programme, die in Publikationen beschrieben wurden, nicht offiziell erhältlich, sondern wurden bislang nur intern in den Arbeitsgruppen für Untersuchungen genutzt [99,108,192].

Neben Softwareapplikationen zur reinen Bildauswertung wurden weltweit weitere Plattformen zur vollautomatisierten γ H2AX-Analyse entwickelt. Während, ähnlich wie beim AKLIDES-System [109], mithilfe der Metafer-Plattform [193] oder einem adaptierten System zur FISH-Analyse [108] automatisiert Mikroskopaufnahmen generiert und γ H2AX-Foci quantifiziert werden können, umfassen die automatisierten Prozesse des RABiT-Systems (Rapid Automated Biodosimetry Tool) nicht nur die Bildaufnahme und γ H2AX-Analyse, sondern darüber hinaus die maschinell-gesteuerte Isolation und Immunfluoreszenzfärbung von MNZ [105,194].

In den entsprechenden Publikationen zur automatisierten γ H2AX-Analyse beschrieben die Entwickler eine gute Übereinstimmung zwischen der jeweiligen getesteten Analysemethode und der manuellen γ H2AX-Foci-Quantifizierung [109,110,160]. Externe Nutzer wiesen jedoch auf Defizite dieser Applikationen im Vergleich zur manuellen Auswertung hin und kritisierten z. B. den Grad der Anpassungsfähigkeit oder höhere Varianzen der Ergebnisse [195,196]. Bisher fehlen unabhängige Veröffentlichungen zu Vergleichsstudien, in denen ein breites Spektrum verfügbarer Programme objektiv bewertet und die jeweiligen Stärken und Schwächen dargelegt werden.

Im Rahmen der Validierung des automatisierten γ H2AX-Assays wurden in dieser Promotionsarbeit neben der dosisabhängigen DSB-Bildung der zeitliche Verlauf ETP-induzierter γ H2AX-Foci sowie deren Reparaturkinetik untersucht. In unstimulierten MNZ konnte bereits 30 min nach Inkubation mit 5 μ M ETP ein Anstieg an γ H2AX-Foci detektiert werden. Während die Anzahl der Foci innerhalb der ersten zwei Stunden im Mittel um einen Focus pro Zelle und Stunde stieg, erreichte die Anzahl an DSB nach 4- bis 8-stündiger Inkubationszeit ihr Maximum. Nach 12 und 24 Stunden wurde indes ein Rückgang der durchschnittlichen Foci-Anzahl pro Zelle detektiert. Eine Ursache hierfür stellt die einsetzende DNA-Reparatur dar. Zwar wurde das ETP nicht aus dem Medium entfernt und konnte erneut DNA-DSB induzieren, jedoch ist anzunehmen, dass durch den Abbau von ETP bzw. durch die Transformation des trans-Etoposids zu inaktivem cis-Etoposid eine Reduktion der aktiven ETP-Konzentration über die Zeit im Medium hervorgerufen wurde [197]. Der zeitliche Verlauf der tatsächlichen ETP-Konzentration im Medium konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht separat geprüft werden.

Die durchgeführten Untersuchungen in MNZ zur Reparaturkinetik ETP-induzierter γ H2AX-Foci wiesen innerhalb der ersten 4 Stunden nach ETP-Entfernung eine Reduktion von 72 % der initial erzeugten γ H2AX-Foci auf. Nach 24 Stunden konnten keine Unterschiede in den γ H2AX-Werten zwischen zuvor mit 5 μ M ETP-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Alvarez-Quilon et al. beschrieben nach 30-minütiger Behandlung von embryonalen Mausfibroblasten mit 10 μ M ETP einen ähnlichen Verlauf der DSB-Reparaturkinetik und beobachteten innerhalb der ersten 3 Stunden einen Rückgang von mehr als 80 % der ETP-induzierten γ H2AX-Foci [198]. Der dargestellte Verlauf spiegelte eine biexponentielle Reparaturkinetik wider und wurde ebenfalls für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB beschrieben [98]. Wie verschiedene Übersichtsartikel anhand wissenschaftlicher Daten schlussfolgerten, setzt sich diese aus einer schnellen Reparaturphase (4 – 6 h), in welcher ca. 80 – 85 % der DNA-DSB repariert werden, und einer langsamen Kinetik zusammen [29,199]. Dabei kann die DNA-Reparaturgeschwindigkeit von der Lokalisation des DSB im Chromatin beeinflusst werden. Diesbezüglich zeigten Studien u. a. von Rube et al., dass insbesondere DSB im kompakten Heterochromatin deutlich langsamer repariert werden als im Euchromatin [173,200]. Zudem können sich die chemische Struktur des DSB bzw. benachbarte Läsionen auf die Komplexität des Schadens und somit auf die notwendigen Reparaturprozesse auswirken [151].

In den zuvor beschriebenen Versuchen dieser Promotionsarbeit wurde der Einfluss des Zytostatikums ETP auf die Induktion von γ H2AX-Foci analysiert. Inwiefern die durchgeführte ETP-Behandlung nicht nur genotoxisch, sondern auch zytotoxisch auf MNZ wirkte, wurde mithilfe des Propidiumiodid-Einbaus und des [3 H]-Thymidin-Zellproliferationstests untersucht.

Im Gegensatz zur γ H2AX-Analyse, welche bereits eine Stunde nach Inkubation mit ETP einen Nachweis von DNA-Schäden in MNZ ermöglichte, betrug die Inkubationszeit dieser beiden Zytotoxizitätstests 72 h. Bei einer Konzentration von 10 μ M ETP konnte nach drei Tagen ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität beobachtet werden, wohingegen γ H2AX-Foci bei deutlich geringeren ETP-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Beim Proliferationstest war indes bereits ab einer ETP-Konzentration von 0,1 μ M eine Inhibition der DNA-Synthese detektierbar. Diese Differenz zwischen beiden Zytotoxizitätsanalysen ist insbesondere auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. Für die Proliferationsanalyse ist eine Aktivierung der Zellen notwendig, während beim Viabilitätstest mittels PI-Einbau unstimulierte Zellen genutzt wurden. Wie u. a. die Studie von Stacey et al. zeigte, reagieren Zellen in der S- und G2-Phase sehr viel empfindlicher auf Etoposid als in der G1-Phase [201].

In den Versuchen, bei denen MNZ für nur eine Stunde mit ETP inkubiert wurden und nach anschließender Entfernung des Zytostatikums eine Kultivierung der Zellen für 72 Stunden erfolgte, zeigte sich erst ab 100 μ M ETP ein signifikanter Rückgang sowohl der Zellviabilität als auch der DNS-Synthese. Im Rahmen dieses Versuches konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob der inhibierende Effekt nach einstündiger Inkubation von 100 μ M ETP auf die primäre Schädigung der Zellen oder auf die Restkonzentration an ETP zurückzuführen ist. Mithilfe spektroskopischer Analysen zeigten Chamani et al. die Bindung von ETP vor allem an H1-Histone [202]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass intrazelluläre Rückstände auch nach zweifachem Waschen in den Proben zurückgeblieben sind.

Allgemein bestätigten die Ergebnisse, insbesondere für unstimulierte MNZ, die höhere Sensitivität und schnellere Durchführung des γ H2AX-Assays im Vergleich zu Zytotoxizitätsbestimmungen. Zudem wurde verdeutlicht, dass trotz genotoxischer Schädigung und nachgewiesenen γ H2AX-Foci DNA-DSB nicht unmittelbar zytotoxisch auf MNZ wirkten.

Die Validierung der automatisierten γ H2AX-Analyse repräsentiert einen wichtigen Punkt der vorliegenden Promotionsarbeit. Zusammenfassend kann anhand der gewonnen Ergebnisse geschlossen werden, dass die untersuchte digitale Immunfluoreszenzanalyse mithilfe des AKLIDES-Systems ein effektives Verfahren zur vollautomatisierten Auswertung von γ H2AX-Foci in unstimulierten MNZ darstellt. Die Untersuchungen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung zwischen manuell und automatisiert erhobenen Daten. Die quantifizierten

Basalwerte für unbehandelte Lymphozyten entsprachen Literaturangaben und es konnte eine dosis- und zeitabhängige Korrelation zwischen der ETP-Konzentration und der Formation von γ H2AX-Foci in MNZ nachgewiesen werden. Neben der Foci-Quantifizierung aus den Immunfluoreszenzaufnahmen ermöglichte die automatisierte Analyse die Erfassung weiterer Parameter, wie Zellintensität oder Focusgröße. Die durchgeführten Vergleiche zwischen verschiedenen γ H2AX-Nachweismethoden bestätigten zum einen die hohe Sensitivität der automatisierten γ H2AX-Focus-Quantifizierung und veranschaulichten zum anderen Unterschiede im Detektionsbereich der einzelnen Verfahren. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass die automatisierte Auswertung des γ H2AX-Immunfluoreszenztests für Untersuchungen zur Reparaturkinetik von DNA-DSB genutzt werden kann.

5.2 Untersuchungen zur Eignung des γ H2AX-Assays hinsichtlich potentieller klinischer Anwendungen

Der wachsende Fortschritt in den sogenannten „Omics“-Technologien, welche u. a. die Bereiche der Genomik (Gene), Transkriptomik (mRNA), Proteomik (Proteine) oder Metabolomik (Stoffwechselprodukte) umfassen, ermöglicht die Identifikation zahlreicher potentieller Biomarker und die Bestimmung individueller Patientenprofile [203]. Im Rahmen der Präzisionsmedizin sollen spezifische diagnostische, prädiktive oder prognostische Marker die Klassifizierung einzelner Patientengruppen ermöglichen, deren Behandlungsstrategie daraufhin, entgegen dem klassischen Einheitskonzept, den individuellen Charakteristika angepasst werden soll [204]. Diese neuen Ansätze werden bisher insbesondere in der Anti-Tumor-Therapie verfolgt [205,206].

Die Analyse von γ H2AX als sensitiver Biomarker für die Quantifizierung von DNA-DSB findet nicht nur in der Grundlagenforschung Anwendung, sondern bietet ebenfalls ein breites Spektrum an potentiellen klinischen Applikationen [207,208]. Hierzu zählen neben der individuellen Anpassung oder der Überwachung von Chemo- oder Bestrahlungstherapien mögliche Anwendungen bei der Biodosimetrie z. B. in der Radio- und Nuklearmedizin oder bei der Diagnostik und Therapie verschiedener altersassoziierter Erkrankungen. Zudem kann der γ H2AX-Assay in Bereichen der pharmazeutischen Entwicklung bzw. Medikamententestung sowie bei Genotoxizitätsanalyse von Umweltgiften genutzt werden [72,78,209].

Wie u. a. der Übersichtsartikel von Geric et al. [210] zusammenfassend darstellt, konnte in zahlreichen Studien nach Behandlung verschiedener Zelllinien mit Zytostatika deren genotoxische Wirkung mithilfe des γ H2AX-Assays nachgewiesen werden. Hierzu zählten u. a.

Antimetabolite (Methotrexat, Gemzitabin, Cytarabin), Crosslinker (Cisplatin), Topoisomerase-I-Inhibitoren (Irinotecan, Topotecan), Topoisomerase-II-Inhibitoren (Etoposid, Mitoxantrone, Doxorubicin) oder der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib. Aneugen wirkende Mikrotubuli-Inhibitoren induzierten hingegen keinen γ H2AX-Anstieg [210].

An Cho-9-Zellen zeigten Nikolova et al., dass genotoxische Substanzen, wie Etoposid, Cisplatin oder Wasserstoffperoxid, dosisabhängig γ H2AX-Foci induzierten und diese Daten positiv mit Ergebnissen aus Zytotoxizitätsanalysen korrelierten. Zusätzlich wiesen die Autoren bei zehn nicht-genotoxisch wirkenden Agenzien zwar eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität nach, aber keine Formation von γ H2AX-Foci [211].

Eine Analyse residueller γ H2AX-Foci erfolgte in der Studie von Banath et al. [212]. Humane Zervixkarzinomzellen (SiHa) wurden für 30 min bzw. 60 min u. a. mit Camptothecin, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid oder Wasserstoffperoxid behandelt, die Substanzen entfernt und nach 24-stündiger Inkubation in frischem Medium der Anteil an Zellen mit residuellen γ H2AX-Foci bestimmt. Abhängig von der Behandlungsdosis konnte für alle Substanzen ein Anstieg an γ H2AX-positiven Zellen detektiert werden. Die Autoren zeigten zudem, dass das Niveau residueller γ H2AX-Foci mit der Überlebensrate im parallel durchgeführten klonogenen Assay (engl. clonogenic survival assay) korrelierte und beschrieben residuale γ H2AX-Foci als Indikator für letale DNA-Schäden [212].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde der γ H2AX-Assay genutzt, um die genotoxischen Effekte verschiedener Klassen immunsuppressiver Substanzen zu analysieren. Diese Agenzien waren im Vorfeld bereits innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe charakterisiert worden. Die für die Untersuchungen gewählten Konzentrationen entsprachen Dosen, bei denen zuvor eine signifikante Inhibition der DNA-Synthese in T-Lymphozyten beobachtet werden konnte [149].

Die Ergebnisse der γ H2AX-Bestimmungen in unstimulierten MNZ demonstrierten nur nach Zytostatikabehandlung (Etoposid, Camptothecin, Daunorubicin und Cytarabin) einen signifikanten Anstieg an γ H2AX-Foci. Die Inkubation mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A, Rapamycin oder Dexamethason sowie mit aktivem TGF- β 1 oder anti-TNF- α führte unter den angewandten Versuchsbedingungen zu keiner signifikanten Erhöhung an γ H2AX-Foci. Anderen Veröffentlichungen beschreiben ebenfalls keine Induktion von DNA-Schäden durch CsA, Rapamycin oder Dexamethason [38,213–217].

In einer Untersuchung von O'Driscoll and Jeggo wurde hingegen beobachtet, dass CsA insbesondere während der Replikationsphase und verstärkt in reparaturdefizienten Zellen zu einer Erhöhung an DNA-DSB führte [218]. Auch demonstrierten andere In-vitro-Studien an MNZ eine inhibierende Wirkung von Immunsuppressiva auf die DNA-Reparatur [219,220].

Unterschiede in der Stärke der induzierten H2AX-Phosphorylierung nach Zytostatikabehandlung wurden in der eigenen Arbeit zwischen der Fluoreszenzmikroskopie und dem Western-Blot-Verfahren deutlich. Während bei der γ H2AX-Foci-Quantifizierung ähnlich viele γ H2AX-Foci für alle Proben nach Zytostatikagabe erfasst werden konnten, wiesen im Western-Blot-Verfahren zwar auch nur die mit Zytostatika behandelten Proben einen signifikanten Anstieg an γ H2AX auf, jedoch wurden größere Differenzen in den γ H2AX-Niveaus detektiert. Hierbei war die γ H2AX-Konzentration der MNZ nach Behandlung mit Camptothecin und Cytarabin im Vergleich zu den Topoisomerase-II-Inhibitoren Etoposid und Daunorubicin deutlich erhöht.

Eine Ursache für diesen Unterschied stellt die Anzahl an MNZ mit pan-nukleärer γ H2AX-Färbung dar, die u. a. in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden kann [76,85,221]. Pan-nukleär gefärbte Zellen wurden bei der automatisierten Immunfluoreszenzmikroskopie nicht in die Foci-Analyse einbezogen und separat aufgeführt. Im Vergleich zu den Substanzen Etoposid und Daunorubicin war nach Behandlung mit Camptothecin und Cytarabin ein deutlich erhöhter Anteil an pan-gefärbten Nuklei im Immunfluoreszenztest zu erkennen. Während Etoposid und Daunorubicin zu den Topoisomerase-II-Hemmern zählen, die auch in unstimulierten Zellen DNA-DSB induzieren, gehört Camptothecin zur Gruppe der Topoisomerase-I-Inhibitoren. Diese erzeugen vorwiegend Einzelstrangbrüche und wirken insbesondere auf Zellen in der S-Phase [114,222]. Cytarabin führt als Cytidinanalogon ebenfalls vor allem in der S-Phase zur DNA-Schädigung [113].

Inwiefern bei diesen Proben die kernweite γ H2AX-Färbung reversible zytostatikainduzierte oder irreversible apoptose-assoziierte DSB darstellt, kann ohne die zusätzliche Verwendung spezifischer Apoptosemarker, wie aktivierte Caspase-3 oder Annexin-V, nicht beurteilt werden. Nach Apoptoseinduktion beschrieben Solier und Pommier eine Ko-Lokalisation zwischen γ H2AX und der aktivierten Caspase-3 [85]. Um parallele Untersuchungen zur Zellviabilität zu ermöglichen, sollte zukünftig ein Nachweis von Apoptosemarkern (z. B. Annexin V, aktivierte Caspase-3, Cytochrom c) in die automatisierte γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse integriert werden.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an unstimulierten MNZ zeigten übereinstimmend mit oben genannten Studien die Tauglichkeit des γ H2AX-Assays zur Identifikation genotoxischer Substanzen. Dennoch müssen zur richtigen Interpretation der Daten die Limitierungen dieses Tests berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zu Analysen von strahleninduzierten DNA-DSB stellen unstimulierte MNZ für pharmakologische Genotoxizitätsscreenings nicht unbedingt ein geeignetes Zellsystem dar. Da viele Zytostatika oder auch andere genotoxische Agenzien in die DNA-Replikation eingreifen und besonders stark auf proliferierende Zellen wirken, sind für Untersuchungen

von chemisch induzierten DNA-Schäden z. B. gut charakterisierte Tumorzelllinien mit ausreichender H2AX-Expression besser geeignet [223]. Zudem wirken viele Substanzen erst nach Biotransformation genotoxisch. Daher sollten insbesondere metabolisch kompetente Zellsysteme genutzt werden, wie z. B. die humane Hepatomzelllinie HepG2, welche ein leberähnliches Enzymprofil exprimiert, oder alternativ aktiviertes Rattenleberhomogenat (S9-Mix) zur Zellkultur gegeben werden [53].

Zudem muss beim γ H2AX-Assay bedacht werden, dass es sich um eine indirekte Nachweismethode für DNA-DSB handelt und Substanzen wie Kinaseinhibitoren Reparaturmechanismen und die Phosphorylierung von γ H2AX beeinflussen und das Ergebnis verfälschen können [170,224].

Zwar gilt die γ H2AX-Analyse derzeit als sensitivste Methode zum Nachweis von DNA-DSB, welche hoch toxische DNA-Schäden darstellen, jedoch können andere DNA-Läsionen mithilfe dieses Tests nicht spezifisch nachgewiesen werden. Aufgrund dessen führen bei Genotoxizitätsanalysen Substanzen, welche z. B. Basenmodifikationen induzieren oder aneugen wirken, im γ H2AX-Assay zu einem falsch-negativem Ergebnis.

In Studien von Watters et al. [168], Smart et al. [225] und Tsamou et al. [226] wurden die Ergebnisse aus der γ H2AX-Analyse mit denen etablierter Genotoxizitätstests verglichen. Watters et al. behandelten embryonale Mausfibroblasten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Etoposid, Bleomycin und Methylmethansulfonat sowie mit den beiden nicht-genotoxischen Substanzen Natriumchlorid und Ampicillin. Während die nicht-genotoxischen Substanzen bei keinem der Tests ein falsch-positives Ergebnis hervorriefen, konnte mittels Comet-Assay nur bei Konzentrationen ab 6 μ M Etoposid ein signifikanter Anstieg an DNA-Schäden detektiert werden. Im Gegensatz dazu induzierten alle drei genotoxischen Substanzen dosisabhängig γ H2AX-Foci und Mikronuklei. Trotz geringer Unterschiede zeigten γ H2AX-Assay und Mikronukleustest eine gute Übereinstimmung bei den Substanzkonzentrationen, die einen nachweisbaren Anstieg an DNA-Schäden induzierten. Die Resultate konnten zusätzlich in durchflusszytometrischen Analysen mit Mauslymphomzellen (L5178Y) bestätigt werden und glichen den Ergebnissen des durchflusszytometrischen Mikronukleustests und des Mauslymphomassays [168].

Bei der Genotoxizitätsbestimmung von Smart et al. konnten mithilfe der durchflusszytometrischen γ H2AX-Analysen vergleichbare Daten zum Amestest und Mauslymphomassay erzielt werden [225]. Tsamou et al. bestimmten bei Analysen von 24 genotoxischen und 40 nicht-genotoxischen Substanzen die Sensitivität und Spezifität des durchflusszytometrischen γ H2AX-Assays sowie des Ames-Tests, des Chromosomenabberationstests, des Mikronukleustests und des Mauslymphomassays. Im Vergleich besaß der γ H2AX-Assay die geringste Sensitivität, zeichnete sich aber durch eine hohe Spezifität aus [226]. Die geringe

Spezifität bzw. hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse und die zeitintensive Durchführung des Chromosomenabberationstests, des Mikronukleustests oder des Mauslymphomassays stellen zwei wesentliche Einschränkungen dar, denen mithilfe des γ H2AX-Assays entgegengewirkt werden kann [86].

Zukünftig könnte die automatisierte γ H2AX-Analyse als schnelle und kostengünstige Methode für Genotoxizitätsscreenings genutzt werden und stellt eine potentielle Erweiterung etablierter Testbatterien dar [211,226].

Im Gegensatz zu den *in vitro* durchgeführten Genotoxizitätsuntersuchungen von Einzelsubstanzen wurde der γ H2AX-Assay in In-vivo-Studien vorwiegend zur Effektivitätsanalyse von Medikamentenkombinationen in der Anti-Tumortherapie genutzt [72,78]. Hierbei wurde u. a. der Einfluss von sogenannten Chemosensibilisatoren untersucht, die z. B. durch Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen (z. B. PARP-Inhibitoren) die Wirksamkeit von Chemotherapien erhöhen sollen. In einer Phase-I-Studie zeigten Kummar et al., dass die Kombination des Topoisomerase-I-Inhibitors Topotecan mit dem PARP-Inhibitor Veliparib einen Anstieg der γ H2AX-Foci in MNZ von Tumorpatienten induzierte und somit den Grad der DNA-Schädigung modulierte [227]. In einer In-vitro-Studie von Kim et al. wurde der γ H2AX-Immunfluoreszenzassay für das Screening einer Substanzbibliothek mit 6800 Agenzien genutzt. In Kombination mit einer ETP-Behandlung von Osteosarkomzellen (U20S) konnten verschiedene Substanzen identifiziert werden, welche die Induktion oder Reparatur von DNA-Schäden modulieren [228].

Die hohe Proliferationsrate von Tumorzellen sowie Defekte in DNA-Reparaturmechanismen bewirken häufig eine erhöhte Sensibilität von Krebszellen gegenüber DNA-schädigenden Chemotherapien und erlauben deren gezielte Eliminierung. Dem entgegen stehen jedoch intrinsische oder erworbene Mechanismen, die zur Therapieresistenz der Tumorzellen führen können. Die Unterschiede hinsichtlich der individuellen Zytostatikasensitivität bzw. Zytostatikaresistenz stellen derzeit eine große Hürde in der chemotherapeutischen Tumorbekämpfung dar [114,115]. Neben Modulationen von DNA-Reparatur- und Apoptoseprozessen ist ein weiterer bedeutender Mechanismus für Chemoresistenzen eine erhöhte Aktivität bzw. Expression von membranständigen ABC-Transportern, die über aktive Prozesse Zytostatika aus der Zelle befördern, wie P-gp [117]. Eine Überexpression von P-gp wurde häufig bei Tumorzellen beschrieben und korrelierte z. T. negativ mit dem Therapieverlauf und der Überlebensrate der Patienten [229,230]. Verschiedene Substanzen besitzen die Eigenschaft, ABC-Transporter zu inhibieren und darüber die Effluxgeschwindigkeit und die intrazellulären Arzneimittelkonzentration zu beeinflussen [115].

Zu diesen Modulatoren zählen die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Rapamycin, welche inhibitorisch u. a. auf den ABC-Transporter P-gp wirken [231,232]. Studien über die ABC-Transporterexpression in hämatopoetischen Zellen zeigten, dass P-gp auch auf der Zellmembran von Lymphozyten exprimiert wird [233].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, ob die Inkubation mit CsA bzw. Rapamycin in Kombination mit ETP bei MNZ zu einer Verstärkung der Zytostatikaisensibilität führt. Diese wurde mithilfe des automatisierten γ H2AX-Assays analysiert.

Zuvor konnte in dieser Arbeit mithilfe des Rhodamin123-Efflux-Assays gezeigt werden, dass CsA und Rapamycin die ABC-Transporter in MNZ inhibieren. Während die intrazelluläre Konzentration des zuvor aufgenommenen Rhodamins bei MNZ, die in Kulturmedium kultiviert wurden, kontinuierlich abnahm, zeigten die Fluoreszenzanalysen bei Proben, die nach der Rhodaminaufnahme mit 10 μ M CsA bzw. Rapamycin versetzt wurden, eine Hemmung des Rhodaminexports. Diese Ergebnisse bestätigten Befunde von Anglicheau et al. [232]. Die Autoren beschrieben an primären humanen Nierenepithelzellen eine dosisabhängige Reduktion des Rhodaminexports und eine maximale P-gp-Hemmung ab Konzentrationen von $> 1 \mu$ M Cyclosporin A bzw. Rapamycin [232]. Bei Rhodamin-Efflux-Untersuchungen an frisch isolierten CD4⁺-T-Lymphozyten sowie CD8⁺-T-Lymphozyten beobachteten Llaudo et al. eine verminderte Effluxrate in CD4⁺-Zellen im Vergleich zu CD8⁺-Zellen. Nach Inkubation mit 2,5 μ M Cyclosporin A konnte insbesondere die erhöhte P-gp-Aktivität in CD8⁺-Zellen inhibiert werden, wohingegen eine Behandlung mit 0,25 μ M Rapamycin bei keiner der Subpopulationen zu einer P-gp-Hemmung führte [234].

Die Daten der eigenen γ H2AX-Analysen demonstrierten, dass eine 16-stündiger Inkubation von MNZ mit CsA oder Rapamycin allein keine γ H2AX-Foci induzierte. Hingegen führte bei MNZ, die mit 5 μ M ETP behandelt wurden, die Anwesenheit dieser Immunsuppressiva im Kulturmedium dosisabhängig zu einem signifikanten Anstieg der ETP-induzierten DNA-DSB. Dieser synergistische Effekt konnte bei Kinetikanalysen in MNZ bereits unmittelbar (30 min) nach Inkubation von ETP in Kombination mit CsA beobachtet werden und war über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h nachweisbar. Die Inkubation von MNZ mit CsA bzw. Rapamycin in Anwesenheit des Zytostatikums Daunorubicin induzierte ebenfalls eine Verstärkung der hervorgerufenen DNA-DSB.

Die Hypothese, dass die erhöhte Zytostatikatoxizität durch einen inhibierenden Effekt von CsA bzw. Rapamycin auf die ABC-Transporter und folglich von der intrazellulären ETP-Akkumulation verursacht wird, bestärkten Untersuchungen nach Gammabestrahlung mit 0,2 Gy. Im Vergleich zur Kontrolle führte die zusätzliche Inkubation der MNZ mit CsA bzw. mit Rapamycin zu keinen signifikanten Unterschieden in der Höhe der strahleninduzierten γ H2AX-Foci.

Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Versuchen an unstimulierten MNZ, wurde in der Studie von Dai et al. an zwei Pankreaskarzinomzelllinien eine erhöhte Radiosensitivität durch Rapamycinbehandlung nachgewiesen [235]. Die Befunde von Zheng et al. zeigten darüber hinaus, dass Rapamycin die Radiosensitivität von Lungenkrebszellen (A549) erhöhte, wohingegen die Kombination aus Bestrahlung und Rapamycinbehandlung bei normalen Lungenzellen (WI-38) einen protektiven Effekt bewirkte [236]. Ferner ergaben Analysen von Herman-Edelstein et al., dass die Reparatur von Wasserstoffperoxid-induzierten DNA-Schäden in humanen MNZ dosisabhängig sowohl durch Cyclosporin A als auch durch Rapamycin inhibiert wurde [219]. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Hautkrebsrisiko von Patienten nach Organtransplantation und einer durch die CsA-Therapie verursachten Reparaturverminderung von UV-induzierten DNA-Schäden [237,238].

In der hier vorliegenden Promotionsarbeit konnten mithilfe der γ H2AX-Analyse diese inhibierenden Effekte von CsA und Rapamycin auf die DNA-Reparatur nicht beobachtet werden. Die Inkubation von unstimulierten MNZ mit CsA bzw. Rapamycin unmittelbar nach DSB-Induktion führte im Vergleich zur Kontrolle zu keinen Änderungen der detektierten residualen Foci. Eine Ursache für diese gegensätzlichen Beobachtungen könnte in der Aktivierung von unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen liegen. Während Wasserstoffperoxid- und UV-induzierte DNA-Schäden vorwiegend durch BER und NER behoben werden, erfolgt die Phosphorylierung von γ H2AX und Reparatur von DNA-DSB vorwiegend über den NHEJ-Mechanismus [20]. Detaillierte Analysen zum Einfluss von Immunsuppressiva auf die unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Der Entwicklung multipler Arzneimittelresistenzen können verschiedene molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Die Sequenzanalyse spezifischer Gene ermöglicht es, Informationen über vorliegende Mutationen bzw. über die Genexpression einer Vielzahl resistenzbeeinflussender Proteine zu gewinnen. Dennoch ist es schwierig, anhand dieser Daten verlässliche Aussagen z. B. über das Proteinlevel und die Aktivität von ABC-Transportern zutreffen [239]. Der γ H2AX-Assay bietet den Vorteil, das Ansprechen von Zellen auf das getestete Arzneimittelregime innerhalb kurzer Zeit als ein Bilanzergebnis, unter Einfluss verschiedener Faktoren wie ABC-Transporteraktivität oder DNA-Reparaturmechanismen, abzubilden. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte mithilfe der γ H2AX-Analysen ein modulierender Effekt von CsA und Rapamycin auf die Zytostatikasensibilität von MNZ gegenüber Etoposid bzw. Daunorubicin beobachtet werden. Dieser synergetische Effekt wurde ebenfalls u. a. von Bisognol et al. und Lacayo et al. beschrieben, die in pharmakokinetischen In-vivo-Studien bei Patienten eine verminderte Plasmaclearance von ETP bei kombinierter Behandlung mit CsA nachwiesen [240,241].

Die Kenntnis über einen Zusammenhang zwischen der ABC-Transporteraktivität und der multiplen Arzneimittelresistenz bei Tumorzellen weckte die Hoffnung, durch Gabe von Chemosensibilisatoren die ABC-Transporteraktivität zu inhibieren und darüber die Effizienz der Chemotherapie zu steigern. Wie die Übersichtsartikel von Ozben et al. [120] und Kathawala et al. [121] zusammenfassend schildern, führten Modulatoren der „ersten Generation“, wie die bereits zugelassenen Substanzen Cyclosporin A oder Verapamil, trotz positiver Voruntersuchungen in klinischen Studien zu starken toxischen Nebenwirkungen oder sie konnten nur unzureichende Effektivitätssteigerungen erzielen. Anschließend wurden Substanzen der „zweiten“ und „dritten Generation“ mit höherer Affinität gegenüber ABC-Transportern und geringeren toxischen Nebenwirkungen entwickelt [120,121]. Obwohl bei Studien Modulatoren der „dritten Generation“ identifiziert wurden, die bereits in nanomolaren Konzentrationen eine signifikante Inhibition von ABC-Transportern induzierten und weniger toxisch waren, ist derzeit keiner der ABC-Transportermodulatoren in Kombination mit Chemotherapien von der US-amerikanischen Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (FDA) zugelassen worden [121]. Wie Shuka et al. [242], He et al. [243] und Anreddy et al. [244] in ihren Artikeln berichteten, konnten Studien zeigen, dass neue Therapeutika wie Tyrosinkinaseinhibitoren ebenfalls Substrate für ABC-Transporter darstellen und einige Tyrosinkinaseinhibitoren, insbesondere in höheren Konzentrationen, ABC-Transporter hemmen. Ob diese Substanzen geeignete Modulatoren in der Bekämpfung von ABC-Transporter-vermittelten Resistenzen darstellen, gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.

Neben der Komplexität molekularer Wechselwirkungen beeinflussen pharmakokinetische Prozesse die Bioverfügbarkeit und das Resultat der Therapie [117]. Diese Mechanismen werden jedoch nicht in In-vitro-Tests abgebildet, was eine Ursache sein kann, weshalb trotz der Entwicklung einer Vielzahl von Chemosensitivitäts- und Chemoresistenztests diese Assays nicht genügend Aussagekraft besitzen, um sie als festen Bestandteil für die personalisierte Therapie in die Klinik zu integrieren [245].

Zum Umdenken raten die Autoren Volm und Efferth. Sie fordern weniger die Chemosensitivitätsanalyse zur Bestimmung des vermeintlich optimalen Arzneimittelregimes als vielmehr die Identifizierung von Chemoresistenzen, um bei positivem Befund alternative Behandlungsstrategien zur klassischen Zytostatikabehandlung, wie Immun- bzw. Antikörpertherapie oder Hyperthermie, anzuwenden [246].

Laut Richtlinien der FDA sollen begleitende In-vitro-Diagnostika die Identifikation von Patienten gewährleisten, die entweder 1. von einer speziellen Behandlung profitieren bzw. 2. erhöhte Risiken für Nebenwirkungen aufweisen, 3. bei denen durch Überwachung des Therapieverlaufs eine Anpassung der Behandlung erfolgen kann, welche die Sicherheit oder

Effektivität steigert, oder mithilfe derer 4. Patienten einer Population bestimmt werden können, für die, im Gegensatz zu anderen Gruppen, die Therapie bereits untersucht und als sicher und effektiv befunden wurde [247]. Inwiefern der γ H2AX-Assay allein oder in Kombination mit anderen Applikationen zur Chemosensitivitäts- bzw. Chemoresistenzbestimmung genutzt werden kann und Patienten folglich aufgrund der individualisierten Behandlung eine verbesserte Überlebensrate, im Vergleich zu bereits etablierten Therapieauswahlfaktoren, aufweisen, muss erst in genau konzipierten, randomisiert kontrollierten Studien gezeigt werden.

Im Rahmen dieser vorliegenden Promotionsarbeit wurde die automatisierte γ H2AX-Analyse neben Untersuchungen von medikamenteninduzierten DNA-DSB auch zur Auswertung strahleninduzierter DNA-Schäden genutzt. Nach Exposition unstimulierter MNZ gegenüber einer ^{137}Cs -Strahlenquelle konnte immunzytochemisch eine dosisabhängige Induktion von γ H2AX-Foci beobachtet werden. Die minimal applizierbare Dosis der genutzten Gammastrahlungsanlagen betrug dabei 0,2 Gy. Bereits 5 min nach Exposition mit 0,2 Gy wurden γ H2AX-Foci nachgewiesen, wohingegen eine Stunde sowie einen Tag nach Bestrahlung mit 0,2 Gy bzw. 2 Gy keine signifikanten Änderungen bei der Zellviabilität mittels PI-Färbung gemessen werden konnten. Drei Tage nach Exposition war die Rate toter Zellen bei einer Bestrahlung mit 2 Gy signifikant und mit 0,2 Gy leicht erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kinetikanalysen zur γ H2AX-Formation in unstimulierten MNZ nach Gammabestrahlung mit Dosen zwischen 0,2 – 5 Gy durchgeführt. Innerhalb der ersten 30 – 60 min nach Exposition konnte ein Anstieg an γ H2AX-Foci verzeichnet werden. Anschließend ging die Anzahl der γ H2AX-Foci stetig zurück. In anderen Publikationen wurde nach Bestrahlung von Lymphozyten eine vergleichbare DSB-Reparaturkinetik mit initialer Formation der γ H2AX-Foci innerhalb der ersten 30 – 60 min nach Exposition sowie ein anschließender biexponentieller Rückgang an γ H2AX-Foci beschrieben [77,162].

Die Daten des γ H2AX-Immunfluoreszenztests demonstrierten erneut die Sensitivität dieses Verfahrens, zeigten aber andererseits die oberen Grenzen bei der Quantifizierung initialer γ H2AX-Foci auf. Aufgrund der zunehmenden Foci-Überlappung und steigender Anzahl pan-nukleär gefärbter Zellen konnten γ H2AX-Foci nur bis zu einer Bestrahlungsdosis von maximal 1 Gy über den gesamten Analysezeitraum (5 min – 24 h) quantifiziert werden. Die Analyse der γ H2AX-Intensität konnte indes über den gesamten Dosisbereich erfolgen. Andere Publikationen beschrieben ebenfalls die Eignung der quantitativen Focus-Erfassung nur bis Bestrahlungsdosen von ca. 1 Gy [98,102,167].

In allen Proben (0 – 5 Gy) konnte 8 h nach Bestrahlung die Anzahl der γ H2AX-Foci erfasst werden. Trotz der bereits ablaufenden DNA-Reparaturprozesse wurde ein dosisabhängiger Unterschied in der Anzahl der quantifizierten γ H2AX-Foci zwischen den Proben ermittelt.

Dennoch muss bedacht werden, dass es sich beim γ H2AX-Assay um einen indirekten Test zum Nachweis von DNA-DSB handelt. Wie Kinner et al. durch Vergleichsanalysen mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) demonstrierten, verläuft die Kinetik der γ H2AX-Foci-Formation zeitverzögert zur DNA-Reparatur. Während nach enzymatischer Phosphorylierung die γ H2AX-Foci erst 30 – 60 min nach DSB-Induktion ihre maximale Größe und Intensität erreichten und anschließend eine Reduktion der H2AX-Phosphorylierung zu beobachten war, konnten die Daten aus den PFGE-Messungen zeigen, dass die DNA-Reparatur unmittelbar nach DSB-Induktion einsetzte [77]. Dennoch stellt γ H2AX einen bedeutenden Indikator zum Nachweis von DNA-DSB dar und ermöglicht durch den dosis- und zeitabhängigen Verlauf biosimetrische Analysen und eine retrospektive Bestimmung von initialen Strahlendosen [98].

Um im Katastrophenfall Betroffene entsprechend ihrer Bestrahlungsdosis klassifizieren zu können, werden bisher u. a. Chromosomenaberrationen oder Mikronuklei bestimmt. Im Rahmen eines europäischen, laborübergreifenden Netzwerks erfolgten in den vergangenen Jahren Untersuchungen zur Eignung des γ H2AX-Assays als biosimetrische Methode [152,195,248]. Hierfür wurden Blutproben unterschiedlich stark bestrahlt und zur Dosisbestimmung an verschiedene Labore versandt. In den anschließend vorgenommenen Untersuchungen zeigte sich, dass der γ H2AX-Assay im Vergleich zu den etablierten Methoden zwar die größten Varianzen aufwies, jedoch für die schnelle Identifikation der am stärksten exponierten Proben besonders geeignet war.

Im Vergleich zum Mikronukleus- oder Comet-Assay zeichnet sich der γ H2AX-Assay durch seine hohe Sensitivität aus und erlaubt die Detektion strahleninduzierter DSB bereits ab ca. 1 – 10 mGy [158,164,249]. Dadurch werden auch biosimetrische In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen in Bereichen mit geringeren Strahlendosen ermöglicht, wie sie bei radiologischen Bildgebungsverfahren mittels Röntgenstrahlung eingesetzt werden [164,196].

Neben der Strahlendosis beeinflussen individuell hoch variable biologische Mechanismen den Grad und die Auswirkungen der induzierten DNA-Schäden. Es wurde vermutet, dass die Formation von γ H2AX als Biomarker zur Bestimmung der individuellen Strahlensensitivität sowohl gesunder als auch pathologisch veränderter Zellen dienen kann. Der γ H2AX-Assay wurde bereits in vielen radioonkologischen Studien genutzt, deren Ergebnisse u. a. in den Übersichtsartikeln von Pouliliou et al. [250] oder Siddiqui et al. [40] gegenübergestellt werden. Hierbei wurde meist der Zusammenhang zwischen dem γ H2AX-Niveau nach Bestrahlung und der Radiosensitivität bzw. Radioresistenz verschiedener Tumorzelllinien analysiert oder der γ H2AX-Assay als potentielle prädiktive Methode zur Detektion strahlenempfindlicher Patienten untersucht.

Während in einigen Studien eine Korrelation zwischen dem induzierten γ H2AX-Niveau und der Strahlensensitivität gezeigt werden konnte, ließ sich dieser Zusammenhang in anderen Studien nicht bestätigen. Eine chancenreiche Applikation des γ H2AX-Assays in der Radiotherapie an Kindern mit soliden Tumoren beschreiben die Studien von Rube et al. [251,252]. Tumorerkrankungen, insbesondere im Kindesalter, können durch genetische Prädispositionen, welche mit Defekten in DNA-Reparaturmechanismen assoziiert sein können, hervorgerufen werden. In diesen Individuen weist auch das Normalgewebe DNA-Reparaturdefizite und eine erhöhte Strahlensensitivität auf, weshalb eine Radiotherapie starke Nebenwirkungen auslösen kann. In ersten Studien konnte der γ H2AX-Assay erfolgreich genutzt werden, um hoch radiosensitive Risikopatienten mit Mutationen in DNA-Reparaturgenen zu identifizieren [251,252].

Analog zu den Chemosensitivitätsbestimmungen wird der γ H2AX-Assay bislang weder in der Radiologie noch in der Nuklearmedizin als klinischer Routinemarker verwendet. Ob γ H2AX die Voraussetzungen für einen prädiktiven oder prognostischen Biomarker erfüllt, muss nach Festlegung standardisierter Protokolle in Multicenter-Studien validiert werden [253].

Neben Tumorerkrankungen steht ein Anstieg an oxidativem Stress und DNA-Schäden in Zusammenhang mit weiteren, vor allem alters-assoziierten Krankheitsbildern. Hierzu zählen u. a. neurodegenerative Defekte, Autoimmunkrankheiten oder Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems [40,254,255]. Inwiefern mithilfe von Indikatoren für DNA-Schäden und insbesondere durch den γ H2AX-Assay auch in diesem klinischen Bereich zusätzliche Erkenntnisse über das Krankheitsstadium oder über Therapieverläufe gewonnen werden können, lässt sich derzeit nicht beantworten. Bislang fehlen hierzu valide Daten aus In-vitro- und In-vivo-Studien. Zusätzlich zu experimentellen Analysen, soll die Aufklärung komplexer molekularer Netzwerke bei der DNA-Schadensantwort, die Bedeutung von γ H2AX sowie die Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen oder Biomarker durch Simulationsprozess anhand von verschiedenen mathematischen Modellen unterstützt werden [208,256–258].

5.3 Untersuchungen zum genotoxischen Potential der (Ultra-)Hochfeld-Magnetresonanztomographie

Während ein genotoxischer Effekt schon bei geringen Dosen an ionisierender Strahlung nachgewiesen werden konnten, lassen die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich nicht-ionisierender elektromagnetischer Felder keine eindeutigen Rückschlüsse auf potentielle DNA-Schädigung in Menschen zu [143]. Zwar können elektromagnetische Wellen aufgrund ihres geringeren Energiegehalts nicht direkt DNA-Strangbrüche induzieren, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie durch sekundäre Reaktionen DNA-Schäden hervorrufen. Ein wahrscheinlicher Mechanismus wäre die Bildung von freien Radikalen, welche folglich verschiedene DNA-Läsionen hervorgerufen [259].

Für jene Bildgebungsverfahren, die auf ionisierender Strahlung basieren, findet im Rahmen des Strahlenschutzes das *ALARA-Prinzip* (engl. as low as reasonably achievable) Anwendung, nach welchem die Strahlenexposition, entsprechend dem aktuellen Stand der Technik, so niedrig zu halten ist, wie sinnvollerweise erreichbar [260]. Während für röntgenografische Bildaufnahmeverfahren vermehrt Strategien zur Dosisreduktion erarbeitet werden [261], zeichnet sich für MRT-Systeme sowohl in der klinischen Routine als auch in der Forschung die Anwendung von Geräten mit immer stärkeren Feldstärken ab [262,263].

Bisherige Studien untersuchten vorwiegend die biologischen Auswirkungen einzelner elektromagnetischer Felder, konnten aber auch dort keine eindeutigen Aussagen z. B. über die mutagene Wirkung von Funkwellen oder Hochspannungsleitungen treffen. Noch wenig ist über die biologische Gefährdung durch eine Kombination unterschiedlicher nicht-ionisierender elektromagnetischer Felder bekannt [128]. Neben einem sehr starken statischen Magnetfeld im Hoch- oder Ultrahochfeldbereich wirken bei der MRT zusätzlich ein Hochfrequenzfeld und Gradientenfelder auf den Patienten ein.

Vor Beginn der MRT-Studien dieser Promotionsarbeit im Jahr 2014 existierten fünf Publikationen, welche die genotoxischen Effekte der MRT *in vitro* und/oder *in vivo* an humanen primären Lymphozyten untersuchten. Die z. T. gegensätzlichen Ergebnisse lassen jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse über MRT-induzierte DNA-Schäden zu. Darüber hinaus erschweren die unterschiedlichen Versuchsanordnungen, Expositionsbedingungen und verwendeten Genotoxizitätsassays den direkten Vergleich der Studienresultate [143].

Simi et al. beschrieben eine dosisabhängige Induktion von Mikronuklei nach In-vitro-Exposition unstimulierter peripherer Vollblutkulturen in einem 1,5 T-MRT für verschiedene Zeitintervalle und Energiedosen. Zusätzlich bestätigten die Autoren eine signifikante Steigerung der Mikronukleizahl in einem Kollektiv aus 8 Patienten nach In-vivo-Untersuchungen im 1,5 T-MRT [136].

Der Einfluss der 3 T-MRT auf die Induktion von DNA-Schäden in peripheren Blutproben eines Spenders wurde von Lee et al. *in vitro* mittels Mikronukleustest, Comet-Assay und Chromosomenaberrationsanalyse untersucht [137]. Die Ergebnisse aller drei Analysemethoden demonstrierten einen Anstieg an DNA-Läsionen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.

Diese Studie wurde von Szerencsi et al. in Blutproben zweier Spender wiederholt [140]. Die Daten zeigten keine signifikanten Veränderungen der DNA-Integrität und konnten die Ergebnisse von Lee et al. nicht bestätigen.

In die Untersuchung von Yildiz et al. waren 28 Personen integriert, die eine 1,5 T-MRT der Hypophyse erhielten [264]. Nach anfänglicher Untersuchung ohne Kontrastmittel und einer Blutentnahme wurde den Probanden gadoliniumhaltiges Kontrastmittel injiziert und die Untersuchung fortgesetzt. Die Ergebnisse des alkalischen Comet-Assays zeigten, dass nach naiver MRT, im Vergleich zum Basalwert, ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg an DNA-Schädigungen detektiert werden konnte, wohingegen am Ende der kontrastmittelverstärkten Untersuchung das ermittelte Niveau an DNA-Läsionen signifikant erhöht war.

Zu einer verstärkten Sensibilisierung für die Problematik potentieller DNA-Schäden nach MRT trug im Jahr 2013 die In-vivo-Studie von Fiechter et al. bei [138]. Hier beschrieben die Autoren nach KM-verstärkter 1,5 T-MRT-Untersuchung von 20 Patienten einen signifikanten Anstieg an γ H2AX-Foci in MNZ und rieten zu ähnlichen Einschränkungen bei MRT-Untersuchungen, wie sie für ionisierende Bildgebungsverfahren, z. B. Röntgen oder CT, gelten.

In keiner der bisherigen Studien wurde, weder *in vitro* noch *in vivo*, der genotoxische Einfluss der Ultrahochfeld-MRT (≥ 7 T) untersucht. Mithilfe des automatisierten γ H2AX-Assays erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Analyse potentieller DNA-Schäden nach 7 T-MRT, in Kooperation mit Prof. Oliver Speck und Frau Mahsa Fatahi aus der Abteilung für Biomedizinische Magnetresonanz des Instituts für Experimentelle Physik sowie mit Dr. Björn Friebe aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin. Diesbezüglich wurde eine In-vitro-Studie mit 16 gesunden Probanden durchgeführt, aus deren Blutproben MNZ isoliert wurden. Die Proben wurden anschließend *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen exponiert. Unter der Annahme, dass mit steigender Energiedosis die induzierten Effekte zunehmen, wurden, im Gegensatz zu In-vivo-Untersuchungen, die EPI-Sequenzen am 7 T-MRT so gewählt, dass sie annähernd der maximal zulässigen spezifischen Absorptionsrate (SAR) entsprachen.

Bei der anschließenden Intensitätsbestimmung des γ H2AX-Immunfluoreszenztests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und Proben, die entweder für eine Stunde im reinen statischen Magnetfeld bzw. für eine Stunde im 7 T-MRT in Kombination mit EPI-Sequenzen exponiert wurden, detektiert werden. Aufgrund der

geringeren Sensitivität der γ H2AX-Intensitätsanalyse wurden ebenfalls nach CT-Exposition in den unstimulierten MNZ keine signifikant erhöhten Werte ermittelt. Die Positivkontrollen zeigten nach Bestrahlung mit 0,2 Gy indes einen signifikanten Anstieg der γ H2AX-Intensität.

Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erwies sich erneut als sensitivere Methode. Hierbei wurden direkt und eine Stunde nach MRT-Exposition keine signifikanten Änderungen der erfassten γ H2AX-Foci detektiert. Eine signifikante Erhöhung konnte indes sowohl nach CT als auch nach Gammabestrahlung gemessen werden. Der Anstieg nach CT-Exposition um mehr als das Sechsfache, von 0,06 Foci/Zelle auf 0,38 Foci/Zelle, entsprach dabei Werten, die von Rothkamm et al. nach Exposition im CT für einen Dosisbereich von ca. 10 – 20 mGy für MNZ publiziert wurde [249]. Die Messungen 24 Stunden nach Exposition zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Negativkontrollen und den MRT-exponierten Proben auf, veranschaulichten aber die DSB-Reparatur und Reduktion der γ H2AX-Foci bei röntgen- bzw. γ -bestrahlten MNZ. Die Ergebnisse der Foci-Quantifizierung spiegeln sich ebenfalls in der prozentualen Verteilung der Foci pro Zelle wider.

Neben der γ H2AX-Bestimmung wurde mittels Viabilitätsanalyse und Proliferationstest das zytotoxische Potential der 7 T-Ultrahochfeld-MRT *in vitro* untersucht. Bei MRT- und CT-exponierten MNZ konnte zu keinem der analysierten Zeitpunkte (24 h, 48 h, 84 h) eine signifikante Veränderung der Zellviabilität beobachtet werden, wohingegen diese bei γ -bestrahlten Zellen (0,2 Gy, 30 Gy) zeit- und dosis-abhängig abnahm. Proliferationsanalysen zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle ebenfalls keine signifikanten Abweichungen bei MRT- und CT-exponierten MNZ auf. Auch nach Gammabestrahlung mit 0,2 Gy konnte kein Rückgang der DNA-Synthese verzeichnet werden. Nur bei Proben, die mit einer Dosis von 30 Gy bestrahlt wurden, war eine signifikante Proliferationshemmung messbar.

Innerhalb dieser In-vitro-Studie an unstimulierten humanen MNZ gesunder Spender konnten somit keine Hinweise gefunden werden, die auf einen genotoxischen oder zytotoxischen Effekt der 7 T-Ultrahochfeld-MRT hindeuten.

Neben der In-vitro-Studie wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine In-vivo-Studie durchgeführt. Hierfür wurden Patienten abhängig von der jeweiligen medizinischen Indikation am MRT untersucht und begleitend die Anzahl der γ H2AX-Foci aus Blutproben vor und nach der Exposition ermittelt. Zusätzlich wurde zwischen MR-Scannern mit unterschiedlichen statischen Magnetfeldstärken differenziert. Zum einen wurden die am häufigsten in der Klinik angewandten MR-Geräte, mit Feldstärken von 1 T, 1,5 T und 3 T, in die Studie integriert und zum anderen ein 7 T-Ultrahochfeldsystem genutzt. Letzteres ist derzeit noch nicht für Routineuntersuchungen zugelassen und darf nur im Rahmen von medizinischen Studien angewandt werden. In Studien von u. a. Heinrich et al. oder Friebe et al. sind übereinstimmend sensorische Effekte von Patienten nach Hochfeld- und

Ultrahochfeld-MRT beschrieben worden, wie Schwindel, Übelkeit oder ein metallischen Geschmack [144,145]. Untersuchungen zu genotoxischen Effekten bei Patienten nach *in vivo* 7 T-MRT wurden bislang noch nicht veröffentlicht.

Neben der Unterscheidung der verschiedenen Feldstärken erfolgte bei Patienten, bei denen eine Routineuntersuchung am 1 T-, 1,5 T- oder 3 T-MR-System durchgeführt wurde, die Klassifizierung hinsichtlich einer nativ durchgeführten oder einer kontrastmittelverstärkten Analyse. Bei je fünf der zehn Patienten der jeweiligen Hochfeld-MRT-Gruppen wurde aus medizinischer Indikation das gadoliniumhaltige Kontrastmittel Gadovist® injiziert. In den derzeit publizierten In-vivo-Studien über den Zusammenhang zwischen MRT und DNA-Läsionen wurde, bis auf die Analysen von Yildiz et al. [264], ein potentieller additiver oder synergistischer Effekt durch das verabreichte Kontrastmittel nicht differenziert betrachtet.

Im Gegensatz zur zuvor durchgeführten In-vitro-Studie, mit Zellen von gesunden Blutspendern, war der durchschnittliche Basalwert aller beteiligten Patienten in der In-vivo-Studie etwas erhöht (0,13 γ H2AX-Foci/Zelle). Dieser Wert entsprach dennoch Basalwerten anderer MRT-Studien [138,141]. Einen Grund für diesen leichten Anstieg kann das höhere Alter der Probanden darstellen. Betrug das Durchschnittsalter bei der In-vitro-Studie 36 Jahre, lag es bei der In-vivo-Studie bei 50 Jahren. Obgleich in unserer Studie keine Korrelation zwischen den Basalwerten und dem Alter der Probanden nachgewiesen werden konnte, beobachteten Sharma et al. in einer von ihnen durchgeführten Populationsstudie einen altersabhängigen Anstieg der basalen γ H2AX-Konzentration [265]. Darüber hinaus handelte es sich bei den MRT-Probanden der In-vivo-Studie um Personen, bei denen aus unterschiedlichen medizinischen Indikationen heraus ein MRT bzw. CT angefertigt wurde. Zwar wurden zuvor Radio- bzw. Chemotherapie, Leukämie bzw. Lymphome und kürzlich durchgeführte radiographische Untersuchungen als Ausschlusskriterium definiert, gleichwohl kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren Ursachen für eine erhöhte DSB-Anzahl darstellten. Die Varianzen der Basalwerte beeinflusste die Studie insofern nicht, da immer nur die Werte vor und nach MRT- bzw. CT-Untersuchung gegenübergestellt wurden. Zusätzlich wurde zum besseren Vergleich neben den gemittelten absoluten γ H2AX-Foci-Werten die relative γ H2AX-Änderung der individuellen Patienten bestimmt.

Zwischen den basalen Werten und den γ H2AX-Foci nach MRT konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Auch die Einzelanalyse der Subgruppen zeigte weder mit zunehmender Feldstärke, noch nach Injektion von Kontrastmittel eine Änderung der Focizahl auf. Im Vergleich zu den Daten der hier durchgeführten In-vivo-Studie wurde nach 1,5 T Herz-MRT in der Untersuchung von Fiechter et al. ein Anstieg von ursprünglich 0,066 Foci auf 0,190 Foci/Zelle (Median) beschrieben. In der eigenen In-vivo-Studie ergaben Berechnungen zur Effektstärke nach Cohen [266] für die MRT-Gruppe eine minimal

detektierbare Effektgröße von 39,6 %. Demzufolge hätten Änderungen von rund 40 % des Basiswertes und somit auch ein von Fiechter et al. beschriebener Anstieg um 188 % erfasst werden können [138].

In Anlehnung an die Studie von Fiechter et al. wurden im Jahr 2015 zwei weitere Publikationen über die γ H2AX-Induktion nach kardialer 1,5 T-MRT veröffentlicht [139,141]. Die In-vivo-Studie von Brand et al. umfasste 45 Patienten, denen direkt vor und 5 min nach kontrastverstärkter MRT Blut abgenommen wurde [141]. Nach manueller Quantifizierung der DNA-DSB betrug der Mittelwert 0,116 Foci/Zelle vor und 0,117 Foci/Zelle nach der Untersuchung. Analog zu den Daten der eigenen In-vivo-Analyse konnten die Autoren keine signifikanten Veränderungen der γ H2AX-Foci nach MRT-Exposition detektieren.

In die Studie von Lancellotti et al. wurden 20 gesunde Probanden integriert, die ein natives 1,5 T-MRT erhielten [139]. Vor sowie zu mehreren Zeitpunkten (1 h bis 1 Jahr) nach der MRT-Exposition wurde den Probanden Blut entnommen und das γ H2AX-Level von T-Lymphozyten, die Blutzellzahlen sowie Aktivierungsmarker analysiert. Während eine Stunde und zwei Stunden nach MRT weder in einzelnen T-Zellsubpopulationen noch in der gesamten T-Lymphozytenpopulation Änderungen im γ H2AX-Niveau durchflusszytometrisch detektierbar waren, beschrieben die Autoren einen signifikanten Anstieg der γ H2AX-Intensität in T-Lymphozyten, die zwei Tage und einen Monat nach MRT-Exposition isoliert wurden. Daten ein Jahr nach Exposition ähnelten erneut den Basalwerten vor Studienbeginn. Bei genauer Betrachtung der Einzelwerte wurde jedoch deutlich, dass ein Anstieg der γ H2AX-Expression nach einem Monat nur bei einigen der Probanden nachgewiesen werden konnte und große interindividuelle Varianzen vorlagen. Zur Verifizierung eines MRT-assoziierten Effekts über einen solchen Zeitraum hätten die Werte zudem mit Daten nicht-exponierter Probanden verglichen werden müssen, um den Einfluss anderer Faktoren auf das γ H2AX-Niveau besser beurteilen zu können. Die Autoren beobachteten zwar eine Korrelation zwischen der individuellen SAR und der γ H2AX-Intensität einen Monat nach Exposition, dennoch können die Daten, aufgrund fehlender Kontrollen, den kausalen Zusammenhang zwischen MRT und einer verzögerten γ H2AX-Formation nicht verlässlich belegen.

Während das Maß der absorbierten Energie in J/kg bei ionisierender Strahlung vorwiegend in der Einheit Gy angegeben wird, entspricht es bei Hochfrequenzfeldern der spezifischen Energiedosis (SED) bzw. der spezifischen Absorption (SA), welche aus dem Produkt der Ganzkörper-SAR und der Expositionsdauer berechnet wird [267]. Wie aus der Tabelle 4.1 ersichtlich wird, führte in der hier durchgeführten In-vivo-Studie eine Erhöhung der statischen Magnetfeldstärke nicht zwangsläufig zu einer Steigerung der SAR, obgleich die Signalstärke des Hochfrequenzfeldes in Abhängigkeit zum B_0 -Feld zunimmt. Da entsprechend der geltenden Richtlinien der Internationalen Elektrotechnischen

Kommission (IEC) die SAR definierte Grenzwerte nicht überschreiten darf, wurden die Protokolle und Sequenzparameter dahingehend angepasst. Aufgrund dieser Einstellungen ähnelten sich die ermittelten SAR verschiedener Protokolle, unabhängig von der Feldstärke. Bei hohen statischen Magnetfeldstärken kann die Ganzkörper-SAR sogar niedriger ausfallen als bei geringeren Feldstärken, da die lokalen SAR-Maxima bedeutend früher erreicht werden.

Im Gegensatz zu den beschriebenen MRT-Studien anderer Autoren wurden in die eigene In-vivo-Analyse, zum besseren Vergleich der Daten mit Werten nach ionisierender Bestrahlung, Probanden integriert, die eine native oder kontrastmittelverstärkte CT-Untersuchung erhielten. Innerhalb der CT-Gruppe konnte nach dem Scan ein signifikanter Anstieg an γ H2AX-Foci beobachtet werden. Hierbei wurde ein besonders starker Anstieg in MNZ detektiert, die 5 min nach den kontrastmittelverstärkten CT-Analysen entnommen wurden. Während bei der vorherigen In-vitro-Studie eine Bestrahlung aller isolierten MNZ der Proben ohne zusätzliche Abschirmung durch Gewebe bzw. Erythrozyten im CT erfolgte, wurde nach In-vivo-CT ein geringerer, aber dennoch signifikanter Anstieg an γ H2AX-Foci gemessen. In einer Studie von Schab et al. beschrieben die Autoren eine Induktion von γ H2AX-Foci sowohl nach *in vitro* als auch *in vivo* Mammographie-Untersuchungen [268]. Ebenfalls konnten andere Autoren nach *in vitro* und *in vivo* CT-Expositionen Steigerungen des γ H2AX-Niveaus detektieren [31,157,158,249,269]. Darüber hinaus führte beim CT die Kombination mit jodhaltigem Kontrastmittel aufgrund einer gesteigerten Energieabsorption zu einer Verstärkung der DNA-Schäden [270–272]. Auch wenn in der eigenen In-vivo-Studie Patienten nach CT in Kombination mit Kontrastmittel einen höheren Anstieg des γ H2AX-Niveaus aufwiesen als Patienten nach nativer CT-Untersuchung, lässt die hieraus nichteindeutig die verstärkende Wirkung des Kontrastmittels ableiten. Im Rahmen der Arbeit diente die CT-Gruppe als Referenz. Um jedoch differenziertere Aussagen treffen zu können, müssen in der Analyse weitere Faktoren berücksichtigt werden. In einer Studie von Grudzenski et al. wurde deutlich, dass der induzierte γ H2AX-Anstieg im Bezug zum jeweiligen Basalwert, zur Bestrahlungsdosis und zur individuellen Reparaturkapazität betrachtet werden muss [270].

Ob ein synergistischer oder ein additiver Effekt nicht nur beim der kontrastverstärkten CT-Analyse, sondern auch durch gadoliniumbasierte Kontrastmittel in der MRT hervorgerufen wird, ist in Bezug auf DNA-Läsionen bisher nicht bekannt. In der eigenen In-vivo-Studie konnten keine Indizien dafür gefunden werden.

Ergebnisse der In-vitro-Studie von Cho et al. deuten nach der Durchführung von Comet-Assays auf einen konzentrations- und inkubationszeitabhängigen genotoxischen Effekt in Lymphozyten nach Behandlung mit Gadolinium(III) ($GdCl_3$) hin, welcher sich in Kombination mit elektromagnetischen Feldern im Niederfrequenzbereich verstärkte [273].

Nach Behandlung von MNZ beobachteten ebenfalls Yongxing et al. mit steigender Gadoliniumkonzentration eine Zunahme von Mikronuklei und eine Reduktion der Zellviabilität [274]. Um die toxische Wirkung von freiem Gadolinium zu vermeiden, wird es bei MRT-Kontrastmitteln in chemischen Komplexen gebunden [133]. Die Verabreichung dieser Gadolinium-Chelate galt als unbedenklich, bis Nebenwirkungen in Zusammenhang mit diesem Kontrastmittel beschrieben wurden. Bei Patienten mit Niereninsuffizienzen wurde die Entwicklung einer nephrogenen systemischen Fibrose beobachtet, welche aus der verminderten Ausscheidung des verabreichten gadoliniumhaltigen Kontrastmittels resultierte [275,276]. Zwar konnten durch Anpassung der Behandlungsmaßnahmen bei Patienten mit Nierenschwäche die Fälle an nephrogener systemischer Fibrose stark reduziert werden, jedoch deuten Daten aktueller Studien darauf hin, dass eine mehrfache Kontrastmittelgabe, vor allem schwacher Chelate, auch bei Patienten mit intakter Nierenfunktion und Blut-Hirn-Schranke zur Anreicherung von Gadolinium im Gehirn führen kann [277,278].

Die unterschiedlichen zugelassenen gadoliniumhaltigen MRT-Kontrastmittel können anhand ihrer chemischen Struktur, welche die biochemischen Eigenschaften und die Stabilität der Chelate beeinflusst, in verschiedene Klassen unterteilt werden [279]. Robic et al. beobachteten unter simulierten In-vivo-Bedingungen die Entchelatisierung eines der zugelassenen Kontrastmittel (Omniscan[®], linear, nicht-ionisch) [280]. In der In-vivo-Studie von Yildiz et al. führte die Exposition der Probanden am 1,5 T-MRT nach Injektion des Kontrastmittels (Omniscan[®]) zu einem signifikanten Anstieg an DNA-Schäden [264]. Stabilere, makrozyklische Kontrastmittel (Gadovist[®] bzw. Dotarem[®]) wurde hingegen in der eigenen Studie sowie in den Untersuchungen von Fiechter et al. [138] und Brand et al. [141] verwendet.

Die Toxizität von Gadovist[®] wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit zusätzlich *in vitro* an MNZ mittels γ H2AX-Assay, [³H]-Thymidin-Proliferationstest und PI-basiertem Zellviabilitätstest analysiert. Während nach 24- und 72-stündiger Inkubation bei keiner der untersuchten Gadovist[®]-Konzentrationen (0,01 – 100 mM) signifikante Änderungen in der Anzahl der γ H2AX-Foci detektiert werden konnten, führte die Behandlung mit 100 mM Gadovist[®] zu einer schwachen, nicht signifikanten Inhibition der DNA-Synthese sowie zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. In einer Publikation von Heinrich et al. wurden vier der derzeit klinisch zugelassenen gadoliniumhaltigen Kontrastmittel, jedoch nicht Gadovist[®], bezüglich ihrer Zytotoxizität an der Nierenzelllinie LLC-PK1 untersucht [281]. Die dafür durchgeführten Zellviabilitätsanalysen mittels MTT-Test zeigten bereits bei der minimal getesteten Dosis von 15,6 mM nach 24-stündiger Inkubation zytotoxische Effekte in LLC-PK1-Zellen.

Zusätzliche Studien, in denen die verschiedenen klinisch zugelassenen Kontrastmittel unter relevanten In-vitro- und In-vivo-Bedingungen analysiert werden, sind notwendig, um die

potentiellen zytotoxischen sowie genotoxischen Risiken bei MRT-Untersuchungen mit gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln weiter aufzuklären und um Unterschiede in der toxischen Wirkung der verschiedenen Präparate zu charakterisieren sowie gegebenenfalls die aktuellen Richtlinien anzupassen.

Neben der Analyse von möglichen transienten DNA-DSB unmittelbar nach der MRT-Exposition wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit auch die langfristige Wirkung der 7 T-MRT im Rahmen einer weiteren Studie untersucht. Die Analyse potentieller genotoxischer Schäden bei Probanden, die häufig gegenüber elektromagnetischen Feldern des 7 T-MRT exponiert waren, erfolgte hierfür mittels γ H2AX-Immunfluoreszenztest und Mikronukleus-Assay. Es wurden die basalen γ H2AX-Foci und Mikronuklei in MNZ dieser 11 Probanden mit denen von altersgleichen Kontrollspendern verglichen, die noch nie im 7 T-MRT exponiert wurden und ein Jahr vor der Studie keine anderen MRT-Untersuchungen erhielten.* Die Gegenüberstellung der Basalwerte zwischen den MRT-exponierten Probanden und der Kontrollgruppe zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der erfassten γ H2AX-Foci und Mikronuklei detektierbar waren und ebenfalls übereinstimmende Daten beim Proliferationsindex ermittelt wurden.

Durch eine zusätzliche In-vitro-Exposition der isolierten MNZ aller 22 Studienteilnehmer am 7 T-MRT konnten ebenfalls keine signifikanten Änderungen der genannten Parameter hervorgerufen werden. Dies bestätigte erneut die Ergebnisse aus der vorherigen In-vitro-Studie. Durch Gammabestrahlung der Proben mit 0,2 Gy konnten im vergleichbaren Umfang sowohl in MNZ der MRT-exponierten Probanden als auch in MNZ der Kontrollspender γ H2AX-Foci und Mikronuklei induziert werden. Anhand dieser Daten gibt es keine Hinweise dafür, dass Personen, die einer häufigen Exposition am Ultrahochfeld-MRT ausgesetzt waren, erhöhte DNA-Schäden aufweisen.

In der Publikation von Lancellotti et al. beschrieben die Autoren einen signifikanten Anstieg des durchschnittlichen γ H2AX-Niveaus in T-Lymphozyten der Studienteilnehmer im Zeitraum zwischen zwei Tagen und einem Monat nach 1,5 T-MRT [139]. Die 11 MRT-exponierten Probanden, die in die eigene Studie integriert waren, mussten aufgrund ihrer häufigen Exposition dieses beschriebene Zeitintervall (2 – 30 Tage nach MRT) ebenfalls abgedeckt haben. Dennoch konnten in dieser Studie keine Unterschiede in der Anzahl der γ H2AX-Foci und Mikronuklei zwischen der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe beobachtet werden.

* Zwar erfolgte bei einem Kontrollprobanden 6 Monate vor Teilnahme an der Studie eine 1,5 T MRT, allerdings unterschieden sich die Daten dieser Person nicht von denen der anderen Kontrollspender.

Wie der Übersichtsartikel von Ghodbane et al. zusammenfasst, konnten bereits in verschiedenen Studien *in vitro* oder *in vivo* (Maus) ein additiver oder synergistischer Effekt von statischen Magnetfeldern auf die Chemotherapie beobachtet werden [282]. Diesbezüglich zeigten die Ergebnisse in der Studie von Liu et al. an K562-Zellen auf, dass durch das zusätzlich einwirkende statische Magnetfeld die Membranpermeabilität der Zellen zunimmt und folglich eine gesteigerte Zytostatikaaufnahme bewirkt [283].

Aufgrund ausbleibender Effekte der Ultrahochfeld-MRT-Exposition auf das γ H2AX-Niveau von MNZ in der hier zuvor durchgeführten MRT-In-vitro-Studie wurde parallel zur Untersuchung von Folgen nach häufiger MRT-Exposition ein zweiter Versuchsansatz in diese Studie integriert. Hierbei wurden γ H2AX-Foci in unstimulierten MNZ beider Probandengruppen durch Zugabe von Etoposid induziert. Während die eine Hälfte der Proben außerhalb des MR-Scanners platziert wurde, erfolgte eine Ko-Exposition der anderen Hälfte im 7 T-MRT. Anschließend wurden die Werte zwischen MRT-Gruppe und Kontrollspendern sowie zwischen einzel- und ko-exponierten Proben verglichen. Hierbei konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im γ H2AX-Niveau zwischen den Proben detektiert werden. Auch Analysen der Reparaturkinetik nach ETP-Entfernung wiesen keine signifikanten Differenzen der Reparaturkapazitäten zwischen den einzelnen Gruppen auf. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass unter den hier getesteten Versuchsbedingungen die 7 T-MRT keinen Einfluss auf die Formation und Reparatur ETP-induzierter γ H2AX-Foci hatte.

Obgleich *in vitro* und *in vivo* in den Analysen dieser Promotionsarbeit keine Veränderungen an γ H2AX-Foci nach MRT-Behandlung detektiert werden konnten, lässt sich daraus nicht direkt die Unbedenklichkeit der MRT ableiten. Anhand der alleinigen γ H2AX-Analyse kann nicht beurteilt werden, ob die MRT kurz- oder langfristig andere genotoxische Schäden (z. B. Einzelstrangbrüche und Basenmodifikationen) induziert oder epigenetische Modifikationen sowie Schäden verursacht durch oxidativen Stress hervorruft.

Ein Grund für die variierenden Ergebnisse der Publikationen über den Zusammenhang zwischen MRT-Exposition und DNA-Schäden kann in der Verwendung unterschiedlicher Genotoxizitätsassays liegen. Im Vergleich zum γ H2AX-Test weist der alkalische Comet-Assay eine geringere Sensitivität beim Nachweis von DNA-DSB auf, allerdings erlaubt dieser die Detektion sowohl von DNA-Doppelstrangbrüchen als auch von DNA-Einzelstrangbrüchen und von alkali-labilen DNA-Stellen [67,68]. Unterschiede zum γ H2AX-Test bestehen auch beim Endpunkt der Genotoxizitätsanalyse mittels Mikronukleustest, der eine 72-stündige Aktivierung der MNZ erfordert. Die detektierten Mikronuklei könnten zwar durch primär induzierte DSB hervorgerufen werden, aber auch aus anderen DNA-Läsionen resultieren, die u. a. in Folge der Zellaktivierung bei der Replikation zur Abspaltung von DNA-Fragmenten führten [60]. Während der Chromosomenaberrationstest den Goldstandard für die

biodosimetrische Analyse nach ionisierender Bestrahlung darstellt, wurde derzeit noch keine Methode als Standard zur Genotoxizitätsanalyse nach Exposition gegenüber nicht-ionisierender Strahlung definiert.

Der Großteil der Studien über MRT-induzierte DNA-Schäden wurde an humanen, nicht-proliferierenden MNZ bzw. Lymphozyten durchgeführt. Studien zur Wirkung von starken statischen Magnetfeldern (> 4 T) auf humane MNZ bzw. T-Lymphozyten zeigten, dass bei unstimulierten Zellen keine Effekte beobachtet werden konnten [284–286]. Im Gegensatz dazu beschrieben Onodera et al. und Norimura et al. jedoch Beeinträchtigungen des Zellwachstums oder der Überlebensrate bei PHA-stimulierten Lymphozyten [284,285]. In der Studie von Aldinucci et al. konnten auch nach Stimulation der MNZ keine Effekte detektiert werden, jedoch wurde bei Versuchen an Jurkat-Zellen eine Reduktion der Proliferationsrate sowie Veränderungen der Membraneigenschaften nach Exposition gegenüber 4,75 T beschrieben [286]. Darüber hinaus dokumentierten Studien Auswirkungen von hohen statischen Magnetfeldern (> 10 T) auf das Zytoskelett und die Viabilität von Fibroblasten und Neuronen [287]. Keine signifikanten Veränderungen im durchflusszytometrisch ermittelten γ H2AX-Niveau konnten indes bei Genotoxizitätsanalysen an humanen Leukämie-Zelllinien (HL-60, KG-1a) 1 h und 24 h nach Exposition im 3 T-MRT detektiert werden [288].

Die Ergebnisse der MRT-Studien dieser Arbeit beschreiben den genotoxischen Einfluss nicht-ionisierender elektromagnetischer Felder in der MRT auf unstimulierte MNZ. Zwar gelten diese Zellen als sehr strahlenempfindlich und stellen aufgrund ihrer Gewinnung ein ideales Zellsystem für In-vivo-Studien dar, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass z. B. stark proliferierende hämatopoetische Stammzellen oder Vorläuferzellen durch MRT-Exposition temporär oder permanent geschädigt werden. Auch ist nicht bekannt, ob Patienten bzw. Zellen mit DNA-Reparaturdefekten nicht nur sensitiver auf ionisierende, sondern eventuell auch auf nicht-ionisierende Strahlung reagieren.

Durch das Einbeziehen von Vergleichswerten nach CT-Untersuchungen konnte in den In-vitro- und In-vivo-Studien dieser Promotionsarbeit erneut bestätigt werden, dass die MRT im Vergleich zum röntgenografischen CT-Verfahren ein weniger genotoxisches Bildgebungsverfahren darstellt. Obwohl in keinem der durchgeführten Experimente nach MRT-Exposition eine signifikante Änderung der untersuchten Genotoxizitäts- und Zytotoxizitätsparameter nachgewiesen werden konnte, sollte entsprechend dem Vorbeugungsprinzip und unter Berücksichtigung der individuellen Nutzen-Risiko-Bewertung sowohl bei CT- als auch bei MRT-Untersuchungen ein angemessener Gebrauch der Verfahren gewährleistet werden.

5.4 Ausblick

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das automatisierte AKLIDES-System eine schnelle und zuverlässige γ H2AX-Analyse ermöglicht. Dennoch gilt es, zukünftig weitere Fragestellungen zur Methodik zu adressieren und entsprechende Studien durchzuführen.

Wie verschiedene Untersuchungen bereits zeigten, können γ H2AX-Foci z. T. auch ohne Induktion von DNA-DSB hervorgerufen werden. Zur präziseren Identifizierung DSB-assoziiertes γ H2AX-Foci dienen daher Ko-Lokalisationsanalysen mit anderen an der Reparatur von DNA-DSB beteiligten Proteinen, wie 53BP1 oder phospho-ATM [169,214]. Diesbezüglich sollte geprüft werden, inwiefern die Sensitivität bzw. die Spezifität des γ H2AX-Assays durch Ko-Lokalisationsuntersuchungen verbessert werden kann. Zudem ist es erstrebenswert, die direkte Ko-Lokalisationsanalyse der einzelnen γ H2AX-Foci mit in die automatisierte Evaluierung zu integrieren. Darüber hinaus wäre auch die parallele Durchführung anderer Immunfluoreszenzfärbungen geeignet. Um beispielsweise eine bessere Charakterisierung apoptotischer und pan-nukleär gefärbter Zellen zu ermöglichen, sollten Protokolle zur parallelen Detektion apoptosespezifischer Biomarker, wie Annexin V oder aktivierte Caspase-3, erarbeitet werden.

Im Gegensatz zu Analysen an unstimulierten MNZ, die synchron in der G_0 -Phase vorliegen, ist insbesondere für Untersuchungen an proliferierenden Zellen bzw. Zelllinien die Unterscheidung der einzelnen Zellzyklusphasen relevant. Daher ist des Weiteren zu prüfen, inwieweit mithilfe des AKLIDES-Systems einzelne Zellzyklusphasen anhand spezifischer Marker oder DNA-Farbstoffe differenziert werden können.

Bei der Verwendung von MNZ ist indes zu berücksichtigen, dass es sich um eine heterogene Population an Immunzellen handelt, die sich aus Monozyten und Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und deren Subpopulationen) zusammensetzt. Da Unterschiede in der Chemosensitivität und Radiosensitivität einzelner Subpopulationen beschrieben wurden, ist zu prüfen, ob individuelle Differenzen in den Verhältnissen dieser Zellgruppen das Ergebnis der γ H2AX-Analyse beeinflussen [234,289]. Einzelne Populationen könnten dann z. B. vor der γ H2AX-Färbung separiert oder durch spezifische Oberflächenfärbungen innerhalb der MNZ detektiert werden. Zudem ist eine Unterscheidung zwischen normalen und neoplastischen Zellen z. B. bei Blutproben von Leukämie- bzw. Lymphompatienten zu treffen.

Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, konnte die γ H2AX-Analyse zum Nachweis einer modulierten Zytostatikasensitivität in MNZ genutzt werden. Zukünftig ist im Rahmen nicht-interventioneller Studien (unter Berücksichtigung bereits publizierter Daten) weiter zu

untersuchen, inwieweit γ H2AX bei Patienten mit Tumorerkrankungen, Reparaturdefekten oder anderen alters-assoziierten Krankheiten einen geeigneten prädiktiven oder prognostischen Biomarker darstellt.

In Hinblick auf eine Anwendung der γ H2AX-Quantifizierung als Hochdurchsatzverfahren in der Routinediagnostik beschrieben Publikationen verschiedene Möglichkeiten zur Vereinfachung des Versuchsprotokolls, indem die γ H2AX-Färbungen z. B. in Mikrotiterplatten oder direkt von Blutaussstrichen aus Kapillarblut erfolgte [290–292]. Hier wäre zu prüfen, ob diese Verfahren eine geeignete Alternative zum ursprünglichen Protokoll darstellen.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit das genotoxische Potential der (Ultra-)Hochfeld-MRT analysiert. Diesbezüglich konnte in keiner der hier durchgeführten Studien eine Veränderung des γ H2AX-Niveaus beobachtet werden. Allerdings existieren derzeit keine Ergebnisse über den Nachweis von DNA-Schäden nach 7 T-MRT, die entweder die Effekte auf proliferierende Zellen (z. B. auf stimulierte MNZ) oder den genotoxischen Einfluss durch Kontrastmittelgabe beschreiben.

Zukünftig wäre darüber hinaus zu untersuchen, ob eine MRT-Exposition eventuell oxidative DNA-Schädigungen verursacht. In einer Untersuchung an Zelllinien konnte kürzlich die Quantifizierung von 8-OH-dG mithilfe des AKLIDES-Systems demonstriert werden [70].

Durch ionisierende Röntgenstrahlung werden neben direkt-induzierten DNA-Strangbrüchen aufgrund von ROS indirekte DNA-Schäden hervorgerufen. Untersuchungen von Kuefner et al. [158] und Brand et al. [159] zeigten bereits, dass durch Vorbehandlung mit Antioxidantien das Niveau strahleninduzierter γ H2AX-Foci signifikant reduziert wurde. Bei einer erhöhten ROS-Produktion in Folge der (Ultra-)Hochfeld-MRT wäre daher nicht nur eine differenzierte Analyse der einzelnen einwirkenden elektromagnetischen Felder durchzuführen, sondern kann ebenfalls der Einfluss von Antioxidantien auf die ROS-Entstehung untersucht werden.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, stellt die automatisierte γ H2AX-Analyse eine Basis für vielfältige Anwendungen dar. Zukünftig kann zum einen die Methodik z. B. durch Ko-Lokalisationsuntersuchungen oder Zellzyklusanalysen optimiert werden. Zum anderen ermöglicht dieses Verfahren sowohl im Rahmen von In-vitro- als auch von In-vivo-Studien die schnelle und standardisierte Analyse chemisch- oder strahleninduzierter DNA-DSB.

Zusammenfassung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) werden durch unterschiedliche endogene bzw. exogene Noxen verursacht und gelten als eine der schwerwiegendsten DNA-Läsionen. Die sensitivste Methode zum Nachweis von DNA-DSB stellt derzeit die immunzytochemische Färbung und anschließende mikroskopische Quantifizierung von γ H2AX-Foci dar, welche im Rahmen der DNA-Reparatur durch Phosphorylierung der umliegenden H2AX-Histone gebildet werden. Um die subjektive und zeitintensive manuelle Auszählung der γ H2AX-Foci durch schnelle, standardisierte Verfahren zu ersetzen, wurden verschiedene Techniken zur automatisierten Auswertung von Immunfluoreszenztests entwickelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung des AKLIDES-Mikroskopiesystems der Medipan GmbH in Bezug auf eine automatisierte γ H2AX-Analyse geprüft werden. Nach Behandlung humaner mononukleärer Zellen (MNZ) des peripheren Blutes mit dem Zytostatikum Etoposid konnte zum einen die dosisabhängige Induktion von γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. Zum anderen demonstrierten Vergleichsanalysen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der manuellen und der automatisierten γ H2AX-Quantifizierung.

Nach erfolgreicher Validierung des automatisierten γ H2AX-Assays sollte zudem dessen potentielle Anwendung als Genotoxizitäts- bzw. Chemosensitivitätstest evaluiert werden. Bei der Behandlung von MNZ mit unterschiedlichen Immunsuppressiva konnte die Substanzklasse der Zytostatika mithilfe des γ H2AX-Immunfluoreszenztests eindeutig differenziert werden. Darüber hinaus ließ sich bei Analysen von Arzneimittelkombinationen die inhibierende Wirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A bzw. Rapamycin auf ABC-Transporter und eine dadurch erhöhte Zytostatikasensitivität der MNZ mithilfe des γ H2AX-Assays nachweisen.

Während der Zusammenhang zwischen Röntgenstrahlung und induzierten γ H2AX-Foci bereits gezeigt wurde, galt es im Rahmen dieser Arbeit, das genotoxische Potential der Magnetresonanztomographie (MRT) zu untersuchen. Die Ergebnisse des γ H2AX-Assays zeigten, dass weder durch In-vitro-MRT-Exposition (7 T) noch durch In-vivo-MRT-Exposition (1 T – 7 T) von Patienten eine Induktion von DNA-DSB in MNZ nachgewiesen werden konnte. Daneben wurde in einer dritten Studie der Einfluss der 7 T-MRT auf die DNA-Integrität bei häufig exponierten Probanden analysiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten erneut keine Unterschiede in der Anzahl an γ H2AX-Foci, an Mikronuklei oder in der DNA-Reparaturkapazität aufgezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichten, dass es sich bei der automatisierten γ H2AX-Analyse um ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Quantifizierung von DNA-DSB handelt, welches für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt werden kann.

Summary

DNA double strand breaks (DSB) can be induced by various endogenous and exogenous agents and represent highly dangerous DNA lesions. Upon DNA DSB formation rapid phosphorylation of the histone variant H2AX (γ H2AX) is induced. Currently, immunofluorescence staining combined with microscopic quantification of γ H2AX foci is described as the most sensitive method for DNA DSB assessment. In order to replace subjective and time-consuming manual quantification of γ H2AX foci and to allow fast and standardized routine screenings, different approaches for automated evaluation of immunofluorescence tests have been developed.

In the present work, we validated the fully automated γ H2AX analysis by the microscopy platform AKLIDES. Treatment of freshly isolated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with the cytostatic drug etoposide resulted in a dose-dependent increase of determined γ H2AX foci. Further, the comparison between manual and automated γ H2AX foci quantification revealed a very good agreement.

In addition to assay validation feasibility studies of γ H2AX as potential biomarker for genotoxicity and chemosensitivity testing were conducted. After treatment of PBMCs with different immunosuppressive drugs the group of cytostatic agents could clearly be distinguished by automated γ H2AX assessment. Further, increased cytostatic chemosensitivity of PBMCs resulted from an inhibitory effect of cyclosporine A and rapamycin on ABC-transporters after co-treatment and could be monitored by γ H2AX immunofluorescence staining.

Whereas γ H2AX foci are known to be induced after medical imaging based on ionizing radiation, we additionally analyzed the genotoxic potential of magnetic resonance imaging (MRI). The results of the γ H2AX assay revealed no induced DNA DSB neither in isolated PBMCs after *in vitro* 7 T MRI exposure nor in PBMCs of patients isolated post *in vivo* MRI examinations (1 T – 7 T). Additionally, we assessed the impact of 7 T MRI exposure on DNA integrity of frequently exposed subjects. In comparison to the control group, no evidence of altered γ H2AX foci and micronuclei incidence were found and no differences in DNA repair capacity could be detected.

In conclusion, this work successfully demonstrated the use of automated γ H2AX analysis as a fast and reliable approach for microscopic DNA DSB quantification which can be utilized for various applications.

Literaturverzeichnis

1. Behl C, Ziegler C. Theorien und Mechanismen des Alterns. In: Behl C, Ziegler C (Hrsg). Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. pp. 23–108.
2. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361: 1475–1485.
3. Trifunovic A. Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2006;1757: 611–617.
4. Harper PS. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Hum Genet.* 2006;119: 226–232.
5. Pepper MS. The human genome and molecular medicine - promises and pitfalls. *South African Med J.* 2010;100: 4460.
6. Graw J. Molekulare Grundlagen der Vererbung. In: Graw J (Hrsg). Genetik. 6. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. pp. 21–53.
7. Koch H-G, Brix J, Heinrich PC. Nucleinsäuren – Struktur und Funktion. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2014. pp. 130–148.
8. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Chromatin. In: Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST (Hrsg). *Lewin's Genes XI.* 11. Aufl. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2014. pp. 223–264.
9. Graw J. Eukaryotische Chromosomen. In: Graw J (Hrsg). Genetik. 6. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. pp. 213–260.
10. Christen P, Jaussi R, Benoit R. Nucleinsäuren. In: Christen P, Jaussi R, Benoit R (Hrsg). Biochemie und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. pp. 81–92.
11. Christen P, Jaussi R, Benoit R. Regulation der Genexpression. In: Christen P, Jaussi R, Benoit R (Hrsg). Biochemie und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. pp. 127–137.
12. Efferth T. Molekulare Toxikologie. Efferth T (Hrsg). Molekulare Pharmakologie und Toxikologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006.
13. Janning W, Knust E. Zytologische Grundlagen. In: Janning W, Knust E (Hrsg). Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008. pp. 14–20.
14. Christen P, Jaussi R, Benoit R. Replikation, Reparatur und Rekombination der DNA. In: Christen P, Jaussi R, Benoit R (Hrsg). Biochemie und Molekularbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. pp. 95–106.
15. Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz R. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14: 5–10.
16. Janning W, Knust E. Genmutation. In: Janning W, Knust E (Hrsg). Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008. pp. 188–202.

17. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res Cell Res Cell Res*. 2008;18: 134–147.
18. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2010;461: 1071–1078.
19. Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C. Struktur der DNA. In: Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C (Hrsg). *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. pp. 61–94.
20. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for Preventing Cancer. *Nature*. 2001;411: 366–374.
21. Dersch P, Jahn D. Veränderungen der Erbsubstanz durch Mutationen. In: Munk K (Hrsg). *Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008. pp. 190–213.
22. Koch H-G, Brix J, Heinrich PC. DNA-Mutationen und ihre Reparatur. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9t. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2014. pp. 559–566.
23. Shaheen M, Allen C, Nickoloff J a, Hromas R. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood*. 2011;117: 6074–82.
24. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5: a012583.
25. Schärer OD. Nucleotide excision repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5: 1–19.
26. Tham KC, Kanaar R, Lebbink JHG. Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. Elsevier B.V.; 2016;38: 75–83.
27. Shibata A, Jeggo PA. DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin Oncol*. Elsevier Ltd; 2014;26: 243–249.
28. Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. 2013;2: 130–143.
29. Jeggo PA, Löbrich M. How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability. *Biochem J*. 2015;471: 1–11.
30. Williams GJ, Hammel M, Radhakrishnan SK, Ramsden D, Lees-Miller SP, Tainer JA. 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)*. 2014;17: 110–120.
31. Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, et al. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 8984–8989.
32. Decottignies A. Alternative end-joining mechanisms: A historical perspective. *Front Genet*. 2013;4: 1–7.
33. Iliakis G, Murmann T, Soni A. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;793: 166–175.
34. Mehta A, Haber JE. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016428.

35. Stavitskaya L, Aubrecht J, Kruhlak NL. Chemical Structure-Based and Toxicogenomic Models. In: Graziano MJ, Jacobson-Kram D (Hrsg). *Genotoxicity and Carcinogenicity Testing of Pharmaceuticals*. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing; 2015. pp. 13–34.
36. Andrae U. Genotoxizitätstests in vitro. In: Greim H, Deml E (Hrsg). *Toxikologie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. pp. 321–341.
37. Brandt B, Petrides PE. Grundlagen der Tumorentstehung. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L (Hrsg). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. pp. 638–648.
38. Hernández LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res*. 2009;682: 94–109.
39. Pogribny IP, Rusyn I. Environmental toxicants, epigenetics, and cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754: 215–32.
40. Siddiqui MS, François M, Fenech MF, Leifert WR. Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2015;766: 1–19.
41. Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: Causal or correlative? *Nucleic Acids Res*. 2007;35: 7417–7428.
42. Ribezzo F, Shiloh Y, Schumacher B. Systemic DNA damage responses in aging and diseases. *Semin Cancer Biol*. Elsevier Ltd; 2016;37-38: 26–35.
43. Deriano L, Roth DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet*. 2013;47: 433–55.
44. Xu Y. DNA damage: A trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 261–70.
45. Ehl S, Speckmann C. T-zelluläre und kombinierte Immundefekte. In: Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger J, Zepp F (Hrsg). *Pädiatrie*. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. pp. 704–720.
46. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet*. 1997;31: 635–662.
47. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. OECD Publishing; 28 Jul 2015. p. 18. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788 [Stand: 6. Feb. 2016]
48. ICH. *Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1)*. 2011;2.
49. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj*. 1975;31: 347–363.
50. OECD. *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 1997. pp. 1–11.
51. Musgrove C, Camps M. Models for Detection of Genotoxicity in vivo: Present and Future. *Mutagenesis*. InTech; 2012. pp. 31–50.

52. Reifferscheid G, Buchinger S. Cell-Based Genotoxicity Testing. In: Scheper T, Belkin S, Gu MB (Hrsg). Whole Cell Sensing System II. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. pp. 85–111.
53. Stopper H. Genotoxizität und chemische Kanzerogenese. In: Vohr H-W (Hrsg). Toxikologie Band 1: Grundlagen der Toxikologie. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011. pp. 133–157.
54. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*. 2009;99: 87–110.
55. OECD. Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2015. pp. 1–10.
56. Lloyd M, Kidd D. The mouse lymphoma assay. *Methods Mol Biol*. 2012;817: 35–54.
57. OECD. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2014. pp. 1–20.
58. Agrawala PK, Adhikari JS, Chaudhury NK. Lymphocyte chromosomal aberration assay in radiation biodosimetry. *J Pharm bioallied Sci*. 2010;2: 197–201.
59. Garcia-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2008;1779: 363–375.
60. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2: 1084–1104.
61. OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2014. pp. 1–26.
62. Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006;88: 1515–1531.
63. Balmus G, Karp N a, Ng BL, Jackson SP, Adams DJ, McIntyre RE. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nat Protoc*. Nature Publishing Group; 2014;10: 205–215.
64. OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2014. pp. 1–21.
65. Bryant HE. DNA double-strand break damage and repair assessed by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2012;920: 315–21.
66. OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing; 2014.
67. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc*. 2006;1: 23–29.
68. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*. 2008;23: 143–151.

69. Rossner P, Sram RJ. Immunochemical detection of oxidatively damaged DNA. *Free Radic Res.* 2012;46: 492–522.
70. Debelec-Butuner B, Bostancı A, Heiserich L, Eberle C, Ozcan F, Aslan M, et al. Automated Cell-Based Quantitation of 8-OHdG Damage. *Methods Mol Biol.* 2016; 2016.
71. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* 1999;146: 905–915.
72. Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2012;327: 123–133.
73. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273: 5858–5868.
74. Falk M, Lukasova E, Kozubek S. Repair of DNA Double-Strand Breaks. In: Gómez-Tejedor GG, Fuss MC (Hrsg). *Radiation Damage in Biomolecular Systems.* Springer Netherlands; 2012. pp. 329–357.
75. Bewersdorf J, Bennett BT, Knight KL. H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 18137–42.
76. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8: 957–67.
77. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 2008;36: 5678–5694.
78. Redon CE, Weyemi U, Parekh PR, Huang D, Burrell AS, Bonner WM. gamma-H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech. Elsevier B.V.;* 2012;1819: 743–756.
79. Scully R, Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen. Elsevier B.V.;* 2013;750: 5–14.
80. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408: 433–9.
81. Summers KC, Shen F, Sierra Potchanant EA, Phipps EA, Hickey RJ, Malkas LH. Phosphorylation: The Molecular Switch of Double-Strand Break Repair. *Int J Proteomics.* 2011;2011: 1–8.
82. Pinto DMS, Flaus A. Structure and Function of Histone H2AX. In: Nasheuer HP (Hrsg). *Genome Stability and Human Diseases.* Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer Science+Business Media B.V.; 2010. pp. 17–42.
83. Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: 2489–98.
84. Caron P, Choudjaye J, Clouaire T, Bugler B, Daburon V, Aguirrebengoa M, et al. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* 2015;13: 1598–1609.

85. Solier S, Pommier Y. The nuclear γ -H2AX apoptotic ring: Implications for cancers and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71: 2289–2297.
86. Garcia-Canton C, Anadón A, Meredith C. γ H2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: Applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke. *Toxicol Vitro. Elsevier Ltd;* 2012;26: 1075–1086.
87. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie.* 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. pp. 51–150; 197–222.
88. Johnston ML, Young EF, Shepard KL. Whole-blood immunoassay for γ H2AX as a radiation biodosimetry assay with minimal sample preparation. *Radiat Environ Biophys.* Springer Berlin Heidelberg; 2015;54: 365–372.
89. Matsuzaki K, Harada A, Takeiri A, Tanaka K, Mishima M. Whole cell-ELISA to measure the γ H2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* Elsevier B.V.; 2010;700: 71–79.
90. Audebert M, Riu A, Jacques C, Hillenweck A, Jamin EL, Zalko D, et al. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett.* Elsevier Ireland Ltd; 2010;199: 182–192.
91. Redon CE, Nakamura AJ, Sordet O, Dickey JS, Gouliava K, Tabb B, et al. γ -H2AX Detection in Peripheral Blood Lymphocytes, Splenocytes, Bone Marrow, Xenografts, and Skin. Didenko V V (Hrsg). *Methods Mol Biol.* Humana Press; 2011;682: 249–270.
92. Reinard T. *Molekularbiologische Methoden.* Stuttgart: Eugen Ulmer; 2010. pp. 195–241.
93. Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 8173–8.
94. Rothe G. Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg). *Cellular Diagnostics: Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry.* Basel, Freiburg: Karger; 2009. pp. 53–88.
95. Mulisch M. Immunlokalisation. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg). *Romeis - Mikroskopische Technik.* 19. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015. pp. 417–443.
96. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res.* Elsevier B.V.; 2013;753: 24–40.
97. Rothkamm K, Horn S. γ -H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita.* 2009;45: 265–271.
98. Horn S, Barnard S, Rothkamm K. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS One.* 2011;6: 1–8.
99. Ivashkevich AN, Martin OA, Smith AJ, Redon CE, Bonner WM, Martin RF, Lobachevsky PN. γ H2AX foci as a measure of DNA damage: A computational approach to automatic analysis. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* Elsevier B.V.; 2011;711: 49–60.

100. Roch-Lefvre S, Valente M, Voisin P, Barquinero J. Suitability of the γ -H2AX Assay for Human Radiation Biodosimetry. In: Nenoï M (Hrsg). *Current Topics in Ionizing Radiation Research*. Rijeka: InTech; 2012. pp. 21–30.
101. Qvarnström OF, Simonsson M, Johansson K-A, Nyman J, Turesson I. DNA double strand break quantification in skin biopsies. *Radiother Oncol*. 2004;72: 311–317.
102. Böcker W, Iliakis G. Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res*. 2006;165: 113–124.
103. Cai Z, Vallis KA, Reilly RM. Computational analysis of the number, area and density of gamma-H2AX foci in breast cancer cells exposed to (111)In-DTPA-hEGF or gamma-rays using Image-J software. *Int J Radiat Biol*. 2009;85: 262–271.
104. Hou Y-N, Lavaf A, Huang D, Peters S, Huq R, Friedrich V, et al. Development of an automated gamma-H2AX immunocytochemistry assay. *Radiat Res*. 2009;171: 360–7.
105. Garty G, Chen Y, Turner HC, Zhang J, Lyulko OV, Bertucci A, et al. The RABiT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage. II. Technological developments. *Int J Radiat Biol*. 2011;87: 776–90.
106. Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, Lisowska H, Wojcik A, Wojewodzka M, et al. FociCounter: A freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2010;696: 16–20.
107. Herbert AD, Carr AM, Hoffmann E, Lichten M. FindFoci: A focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS One*. 2014;9: 1–33.
108. Hernández L, Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting. *Int J Mol Sci*. 2013;14: 15810–26.
109. Runge R, Hiemann R, Wendisch M, Kasten-Pisula U, Storch K, Zöphel K, et al. Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®. *Int J Radiat Biol*. 2012;88: 439–47.
110. Oeck S, Malewicz NM, Hurst S, Rudner J, Jendrossek V. The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage. *Radiat Oncol. Radiation Oncology*; 2015;10: 163.
111. Lapytsko A, Kollarovic G, Ivanova L, Studencka M, Schaber J. FoCo: a simple and robust quantification algorithm of nuclear foci. *BMC Bioinformatics*. *BMC Bioinformatics*; 2015;16: 392.
112. Schütte J, Barth J. Zytostatische Chemotherapie. In: Hiddemann W, Bartram CR, (Hrsg). *Die Onkologie*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. pp. 401–436.
113. Retz M, Gschwend J. Zytostatika. In: Retz M, Gschwend J (Hrsg).. *Medikamentöse Tumorthherapie in der Uroonkologie*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010. pp. 29–38.
114. Freissmuth M. Chemotherapie von Tumorerkrankungen. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg). *Pharmakologie & Toxikologie*. Berlin Heidelberg: Springer; 2012. pp. 723–764.

115. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008;9: 105–127.
116. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*. 2003;22: 7496–7511.
117. Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65: 3145–3167.
118. Kapoor K, Sim HM, Ambudkar SV. Multidrug Resistance in Cancer: A Tale of ABC Drug Transporters. In: Bonavida B (Hrsg). *Molecular Mechanisms of Tumor Cell Resistance to Chemotherapy Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics*. New York: Springer; 2013. pp. 1–34.
119. Cortada CM, Escobar A, Bramuglia GF, Niselman AV, Carballo MA, Rubio MC. Lymphocyte P-glycoprotein variability in healthy individuals. *Medicina (B Aires)*. 2009;69: 619–624.
120. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett*. 2006;580: 2903–2909.
121. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby Jr. CR, Chen Z-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resist Updat*. Elsevier Ltd; 2015;18: 1–17.
122. Wong ILK, Wang BC, Yuan J, Duan LX, Liu Z, Liu T, et al. Potent and Nontoxic Chemosensitizer of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in Cancer: Synthesis and Evaluation of Methylated Epigallocatechin, Gallic acid, and Dihydromyricetin Derivatives. *J Med Chem*. 2015;58: 4529–4549.
123. Sauer R. Strahlenpathologie. In: Kauffmann G, Sauer R, Weber WA (Hrsg). *Radiologie*. 4. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011. pp. 65–94.
124. Grupen C. Nicht-ionisierende Strahlung. In: Grupen C (Hrsg). *Grundkurs Strahlenschutz*. 4., überarb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2008. pp. 214–222.
125. Krieger H. Strahlungsarten und Strahlungsfelder. In: Krieger H (Hrsg). *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 4. Aufl. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; 2012. pp. 17–51.
126. Carpenter DO. Human disease resulting from exposure to electromagnetic fields. *Rev Environ Health*. 2013;28: 159–172.
127. Sauer R. Strahlenbiologie. In: Kauffmann G, Sauer R, Weber WA (Hrsg). *Radiologie*. 4. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011. pp. 35–64.
128. Hartwig V, Giovannetti G, Vanello N, Lombardi M, Landini L, Simi S. Biological effects and safety in magnetic resonance imaging: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6: 1778–98.
129. Wessels G. Medizinische Bildgebung. In: Wintermantel E, Ha S-W (Hrsg). *Medizintechnik*. 5. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. pp. 1071–1111.
130. Dössel O. Die bildgebenden Verfahren in der Medizin. In: Dössel O, Buzug TM (Hrsg). *Medizinische Bildgebung*. 7. Aufl. Berlin, Boston: DE GRUYTER; 2014. pp. 1–8.

131. Möller HE. Grundlagen der MRT. In: Rummeny EJ, Reimer P, Heindel W (Hrsg). Ganzkörper-MR-Tomographie. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. pp. 1–26.
132. Hartwig V. Engineering for safety assurance in MRI: Analytical, numerical and experimental dosimetry. *Magn Reson Imaging*. Elsevier Inc.; 2015;33: 681–689.
133. Radeleff B, Schneider B, Stegen P, Kauffmann GW. Röntgendiagnostik. In: Kauffmann G, Sauer R, Weber WA (Hrsg). Radiologie. 4. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011. pp. 95–132.
134. Kathiravan S, Kanakaraj J. A Review on Potential Issues and Challenges in MR Imaging. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013: 783715.
135. Berrington de Gonzalez A, Kleinerman RA, McAreavey D, Rajaraman P. Cardiac MR Imaging and the Specter of Double-Strand Breaks. *Radiology*. 2015;277: 329–31.
136. Simi S, Ballardín M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G, et al. Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res*. 2008;645: 39–43.
137. Lee JW, Kim MS, Kim YJ, Choi YJ, Lee Y, Chung HW. Genotoxic effects of 3 T magnetic resonance imaging in cultured human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2011;32: 535–42.
138. Fiechter M, Stehli J, Fuchs TA, Dougoud S, Gaemperli O, Kaufmann PA. Impact of cardiac magnetic resonance imaging on human lymphocyte DNA integrity. *Eur Heart J*. 2013;34: 2340–5.
139. Lancellotti P, Nchimi A, Delierneux C, Hego A, Gosset C, Gothot A, et al. Biological Effects of Cardiac Magnetic Resonance on Human Blood Cells. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8: e003697.
140. Szerencsi Á, Kubinyi G, Váliczkó É, Juhász P, Rudas G, Mester Á, et al. DNA integrity of human leukocytes after magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Biol*. 2013;89: 870–6.
141. Brand M, Ellmann S, Sommer M, May MS, Eller A, Wuest W, et al. Influence of Cardiac MR Imaging on DNA Double-Strand Breaks in Human Blood Lymphocytes. *Radiology*. 2015;277: 406–12.
142. Kaufmann PA. Good Study, Bad Timing. *Radiology*. 2016;278: 633–4.
143. Vijayalaxmi, Fatahi M, Speck O. Magnetic resonance imaging (MRI): A review of genetic damage investigations. *Mutat Res Rev Mutat Res*. Elsevier B.V.; 2015;764: 51–63.
144. Friebe B, Wollrab A, Thormann M, Fischbach K, Ricke J, Grueschow M, et al. Sensory perceptions of individuals exposed to the static field of a 7T MRI: A controlled blinded study. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41: 1675–1681.
145. Heinrich A, Szostek A, Meyer P, Nees F, Rauschenberg J, Gröbner J, et al. Cognition and sensation in very high static magnetic fields: a randomized case-crossover study with different field strengths. *Radiology*. 2013;266: 236–45.
146. Hiemann R, Büttner T, Krieger T, Roggenbuck D, Sack U, Conrad K. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2009;9: 17–22.

147. Rajewsky MF. Zellproliferation in normalen und malignen Geweben:3H-Thymidin-Einbau in vitro unter Standardbedingungen. *Biophysik*. 1966;3: 65–93.
148. Hallbach J. Präanalytische und analytische Phase. In: Hallbach J (Hrsg). *Klinische Chemie und Hämatologie: Biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*. 3., überarb. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2011. pp. 1–20.
149. Guttek K, Reinhold D. Stimulated human peripheral T cells produce high amounts of IL-35 protein in a proliferation-dependent manner. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2013;64: 46–50.
150. Pubmed. Suchanfrage: "gamma-H2AX 2015". [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=\(\(\(\$\gamma\$ H2AX\) OR \$\gamma\$ -H2AX\) OR gamma- H2AX\) OR gammaH2AX\) AND \("2015/01/01"\[Date - Publication\] : "2015/12/31"\[Date - Publication\]\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=(((gamma-H2AX) OR gamma-H2AX) OR gamma-H2AX) OR gammaH2AX) AND () [Stand: 6. Feb. 2016].
151. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56: 491–504.
152. Rothkamm K, Horn S, Scherthan H, Rößler U, De Amicis A, Barnard S, et al. Laboratory Intercomparison on the γ -H2AX Foci Assay. *Radiat Res*. 2013;180: 149–55.
153. Knütter I, Hiemann R, Brumma T, Buttner T, Grossmann K, Cusini M, et al. Automated interpretation of ANCA patterns - a new approach in the serology of ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Res Ther*. BioMed Central Ltd; 2012;14: R271.
154. Grossmann K, Roggenbuck D, Schröder C, Conrad K, Schierack P, Sack U. Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytom Part A*. 2011;79 A: 118–125.
155. Sowa M, Grossmann K, Knütter I, Hiemann R, Röber N, Anderer U, et al. Simultaneous automated screening and confirmatory testing for vasculitis-specific ANCA. *PLoS One*. 2014;9.
156. Roch-Lefèvre S, Mandina T, Voisin P, Gaëtan G, Mesa JEG, Valente M, et al. Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*. 2010;174: 185–94.
157. Kuefner MA, Grudzinski S, Hamann J, Achenbach S, Lell M, Anders K, et al. Effect of CT scan protocols on x-ray-induced DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing coronary CT angiography. *Eur Radiol*. 2010;20: 2917–24.
158. Kuefner M, Brand M, Ehrlich J, Braga L. Effect of Antioxidants on X-ray-induced γ -H2AX Foci in Human Blood Lymphocytes: Preliminary Observations. *Radiobiology*. 2012;264: 59–67.
159. Brand M, Sommer M, Ellmann S, Wuest W, May MS, Eller A, et al. Influence of Different Antioxidants on X-Ray Induced DNA Double-Strand Breaks (DSBs) Using γ -H2AX Immunofluorescence Microscopy in a Preliminary Study. *PLoS One*. 2015;10: e0127142.
160. Valente M, Voisin P, Laloi P, Roy L, Roch-Lefèvre S. Automated gamma-H2AX focus scoring method for human lymphocytes after ionizing radiation exposure. *Radiat Meas*. Elsevier Ltd; 2011;46: 871–876.

161. Redon CE, Nakamura AJ, Gouliava K, Rahman A, Blakely WF, Bonner WM. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One*. 2010;5: e15544.
162. Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res*. 2009;43: 1171–1178.
163. Moroni M, Maeda D, Whitnall MH, Bonner WM, Redon CE. Evaluation of the gamma-H2AX assay for radiation biodosimetry in a swine model. *Int J Mol Sci*. 2013;14: 14119–14135.
164. Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 5057–5062.
165. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, et al. DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: Implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res*. 2008;14: 6546–6555.
166. Kuefner MA, Grudzenski S, Schwab SA, Wiederseiner M, Heckmann M, Bautz W, et al. DNA double-strand breaks and their repair in blood lymphocytes of patients undergoing angiographic procedures. *Invest Radiol*. 2009;44: 440–6.
167. Borràs M, Armengol G, De Cabo M, Barquinero J-F, Barrios L. Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity. *Int J Radiat Biol*. 2015;3002: 1–10.
168. Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2009;679: 50–58.
169. Marková E, Schultz N, Belyaev IY. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol*. 2007;83: 319–329.
170. Balajee AS, Geard CR. Replication protein a and γ -H2AX foci assembly is triggered by cellular response to DNA double-strand breaks. *Exp Cell Res*. 2004;300: 320–334.
171. Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ. Gamma-H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS One*. 2007;2: 1–8.
172. Kim JA, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber JE. Heterochromatin is refractory to γ -H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol*. 2007;178: 209–218.
173. Rube CE, Lorat Y, Schuler N, Schanz S, Wennemuth G, Rube C. DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10: 427–37.
174. Schanz S, Schuler N, Lorat Y, Fan L, Kaestner L, Wennemuth G, et al. Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. *DNA Repair (Amst)*. Elsevier B.V.; 2012;11: 823–832.

175. Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Nowsheen S, et al. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 17992–17997.
176. Rajan M, Mortusewicz O, Rothbauer U, Hastert FD, Schmidthals K, Rapp A, et al. Generation of an alpaca-derived nanobody recognizing γ -H2AX. *FEBS Open Bio. Federation of European Biochemical Societies;* 2015;5: 779–788.
177. Li W, Li F, Huang Q, Shen J, Wolf F, He Y, et al. Quantitative, noninvasive imaging of radiation-induced DNA double-strand breaks in vivo. *Cancer Res.* 2011;71: 4130–7.
178. Jakob B, Splinter J, Durante M, Taucher-Scholz G. Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 3172–3177.
179. Georgescu W, Osseiran A, Rojec M, Liu Y, Bombrun M, Tang J, et al. Characterizing the DNA Damage Response by Cell Tracking Algorithms and Cell Features Classification Using High-Content Time-Lapse Analysis. *PLoS One.* 2015;10: e0129438.
180. BD Biosciences. Multicolor Flow Cytometry - Bright is Better. <http://www.bdbiosciences.com/br/research/multicolor/brilliant> [Stand: 3. Juni 2016]
181. Chattopadhyay PK, Gaylord B, Palmer A, Jiang N, Raven MA, Lewis G, et al. Brilliant violet fluorophores: A new class of ultrabright fluorescent compounds for immunofluorescence experiments. *Cytom Part A.* 2012;81 A: 456–466.
182. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2004;281: 301–311.
183. MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res.* 2003;159: 759–767.
184. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2006;314: 73–80.
185. Basiji DA, Ortyn WE, Liang L, Venkatachalam V, Morrissey P. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clin Lab Med.* 2007;27: 653–670.
186. Henriksen M, Miller B, Newmark J, Al-Kofahi Y, Holden E. Laser scanning cytometry and its applications: A pioneering technology in the field of quantitative imaging cytometry. *Methods Cell Biol.* 2011;102: 159–205.
187. Zhao H, Albino AP, Jorgensen E, Traganos F, Darzynkiewicz Z. DNA damage response induced by tobacco smoke in normal human bronchial epithelial and A549 pulmonary adenocarcinoma cells assessed by laser scanning cytometry. *Cytometry A.* 2009;75: 840–7.
188. Furia L, Pelicci PG, Faretta M. A computational platform for robotized fluorescence microscopy (II): DNA damage, replication, checkpoint activation, and cell cycle progression by high-content high-resolution multiparameter image-cytometry. *Cytom Part A.* 2013;83 A: 344–355.

189. Bourton EC, Plowman PN, Zahir SA, Senguloglu GU, Serrai H, Bottley G, et al. Multispectral imaging flow cytometry reveals distinct frequencies of γ -H2AX foci induction in DNA double strand break repair defective human cell lines. *Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol.* 2012;81: 130–137.
190. Parris CN, Adam Zahir S, Al-Ali H, Bourton EC, Plowman C, Plowman PN. Enhanced γ -H2AX DNA damage foci detection using multimagnification and extended depth of field in imaging flow cytometry. *Cytometry A.* 2015; 717–723.
191. Mathews ST, Plaisance EP, Kim T. Imaging systems for westerns: chemiluminescence vs. infrared detection. *Methods Mol Biol.* 2009;536: 499–513.
192. Anderson D, Andrais B, Mirzayans R, Siegbahn EA, Fallone BG, Warkentin B. Comparison of two methods for measuring gamma-H2AX nuclear fluorescence as a marker of DNA damage in cultured human cells: applications for microbeam radiation therapy. *J Instrum.* 2013;8: 6008–16.
193. Schunck C, Johannes T, Varga D, Lörch T, Plesch A. New developments in automated cytogenetic imaging: Unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenet Genome Res.* 2004;104: 383–389.
194. Turner HC, Brenner DJ, Chen Y, Bertucci A, Zhang J, Wang H, et al. Adapting the γ -H2AX assay for automated processing in human lymphocytes. 1. Technological aspects. *Radiat Res.* 2011;175: 282–90.
195. Rothkamm K, Barnard S, Ainsbury EA, Al-hafidh J, Barquinero JF, Lindholm C, et al. Manual versus automated γ -H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident? *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* Elsevier B.V.; 2013;756: 170–173.
196. Kuefner MA, Brand M, Engert C, Schwab SA, Uder M. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. *RöFo.* 2015;187: 872–8.
197. Mader RM, Steger GG, Moser K, Rainer H, Krenmayr P, Dittrich C. Instability of the anticancer agent etoposide under in vitro culture conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;27: 354–60.
198. Álvarez-Quilón A, Serrano-Benítez A, Lieberman JA, Quintero C, Sánchez-Gutiérrez D, Escudero LM, et al. ATM specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked DNA ends. *Nat Commun.* 2014;5: 3347.
199. Goodarzi AA, Jeggo P, Loblrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst).* Elsevier B.V.; 2010;9: 1273–1282.
200. Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One.* 2012;7.
201. Stacey DW, Hitomi M, Chen G. Influence of cell cycle and oncogene activity upon topoisomerase II α expression and drug toxicity. *Mol Cell Biol.* 2000;20: 9127–9137.
202. Chamani E, Rabbani-Chadegani A, Zahraei Z. Spectroscopic detection of etoposide binding to chromatin components: The role of histone proteins. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* Elsevier B.V.; 2014;133: 292–299.

203. Unger FT, Witte I, David KA. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72: 729–757.
204. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Großhennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: A review. *Hum Genet.* 2012;131: 1627–1638.
205. Yaromina A, Krause M, Baumann M. Individualization of cancer treatment from radiotherapy perspective. *Mol Oncol. Elsevier B.V.*; 2012;6: 211–221. d
206. Schmidt KT, Chau CH, Price DK, Figg WD. Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. *J Clin Pharmacol.* 2016; 2–3.
207. Redon CE, Nakamura AJ, Martin OA, Parekh PR, Weyemi US, Bonner WM. Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY).* 2011;3: 168–74.
208. Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX: Functional roles and potential applications. *Chromosoma.* 2009;118: 683–692.
209. Matthaios D, Hountis P, Karakitsos P, Bouros D, Kakolyris S. H2AX a promising biomarker for lung cancer: a review. *Cancer Invest.* 2013;31: 582–99.
210. Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. γ -H2AX as a biomarker for DNA double-strand breaks in ecotoxicology. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014;105: 13–21.
211. Nikolova T, Dvorak M, Jung F, Adam I, Krämer E, Gerhold-Ay A, et al. The γ H2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: comparison of H2AX phosphorylation with cell death response. *Toxicol Sci.* 2014;140: 103–17.
212. Banáth JP, Klokov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. Residual γ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer.* 2010;10: 4.
213. Zwanenburg TS, Cordier A. No cyclosporin-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Mutat Res.* 1994;320: 217–221.
214. Pospelova TV., Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle.* 2009;8: 4112–4118.
215. Chen H, Ma Z, Vanderwaal RP, Feng Z, Gonzalez-Suarez I, Wang S, et al. The mTOR inhibitor rapamycin suppresses DNA double-strand break repair. *Radiat Res.* 2011;175: 214–24.
216. Bryce SM, Shi J, Nicolette J, Diehl M, Sonders P, Avlasevich S, et al. High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51: 260–6.
217. Buick JK, Moffat I, Williams A, Swartz CD, Recio L, Hyduke DR, et al. Integration of metabolic activation with a predictive toxicogenomics signature to classify genotoxic versus nongenotoxic chemicals in human TK6 cells. *Environ Mol Mutagen.* 2015;56: 520–34.
218. O’Driscoll M, Jeggo PA. CsA can induce DNA double-strand breaks: implications for BMT regimens particularly for individuals with defective DNA repair. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41: 983–989.

219. Herman-Edelstein M, Rozen-Zvi B, Zingerman B, Lichtenberg S, Malachi T, Gafter U, et al. Effect of immunosuppressive drugs on DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother Biomedicine pharmacotherapic*. 2012;66: 111–5.
220. Ori Y, Herman-Edelstein M, Zingerman B, Rozen-Zvi B, Gafter U, Malachi T, et al. Effect of immunosuppressive drugs on spontaneous DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother Biomedicine pharmacotherapic*. Elsevier Masson SAS; 2012;66: 409–13.
221. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275: 9390–9395.
222. Zhao H, Rybak P, Dobrucki J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Relationship of DNA damage signaling to DNA replication following treatment with DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone, or etoposide. *Cytometry A*. 2012;81: 45–51.
223. Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, Ji J, Bonner WM, Kinders RJ, et al. Histone γ H2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res*. 2010;16: 4532–4542.
224. Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, et al. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res*. 2006;604: 8–18.
225. Smart DJ, Ahmed KP, Harvey JS, Lynch AM. Genotoxicity screening via the γ H2AX by flow assay. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. Elsevier B.V.; 2011;715: 25–31.
226. Tsamou M, Jennen DGJ, Claessen SMH, Magkoufopoulou C, Kleinjans JCS, Van Delft JHM. Performance of in vitro γ H2AX assay in HepG2 cells to predict in vivo genotoxicity. *Mutagenesis*. 2012;27: 645–652.
227. Kummar S, Chen A, Ji J, Zhang Y, Reid JM, Ames M, et al. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Res*. 2011;71: 5626–5634.
228. Kim S, Jun DH, Kim HJ, Jeong K-C, Lee C-H. Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response. *J Biomol Screen Off J Soc Biomol Screen*. 2011;16: 259–265.
229. Volm M, Efferth T. Role of P-Glycoprotein for Resistance of Tumors to Anticancer Drugs: From Bench to Bedside. In: Efferth T (Hrsg). *Resistance to Targeted ABC Transporters in Cancer*. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer; 2015. pp. 1–26.
230. Trnková Z, Bedrlíková R, Marková J, Michalová K, Stöckbauer P, Schwarz J. Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma*. 2007;54: 383–90.
231. Aouali N, Eddabra L, Macadré J, Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56: 61–70.
232. Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, Méria P, et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney Int*. 2006;70: 1019–25.

233. van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, Scheffer GL, de Gruijl TD, Jansen G, et al. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009;86: 1075–1087.
234. Llaudó I, Cassis L, Torras J, Bestard O, Franquesa M, Cruzado JM, et al. Impact of Small Molecules Immunosuppressants on P-glycoprotein Activity and T-cell Function. *J Pharm Pharm Sci.* 2012;15: 407–419.
235. Dai ZJ, Gao J, Kang HF, Ma YG, Ma XB, Lu WF, et al. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) enhances radiosensitivity in pancreatic carcinoma cells. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7: 149–59.
236. Zheng H, Wang M, Wu J, Wang ZM, Nan HJ, Sun H. Inhibition of mTOR enhances radiosensitivity of lung cancer cells and protects normal lung cells against radiation. *Biochem Cell Biol.* 2016;94: 213–20.
237. Thoms KM, Kuschal C, Oetjen E, Mori T, Kobayashi N, Laspe P, et al. Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin: Implications for tumorigenesis under immunosuppression. *Exp Dermatol.* 2011;20: 232–236.
238. Kuschal C, Thoms KM, Schubert S, Schäfer A, Boeckmann L, Schön MP, et al. Skin cancer in organ transplant recipients: Effects of immunosuppressive medications on DNA repair. *Exp Dermatol.* 2012;21: 2–6.
239. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol.* 2012;82: 1008–21.
240. Bisogno G, Cowie F, Boddy A, Thomas HD, Dick G, Pinkerton CR. High-dose cyclosporin with etoposide--toxicity and pharmacokinetic interaction in children with solid tumours. *Br J Cancer.* 1998;77: 2304–2309.
241. Lacayo NJ, Lum BL, Becton DL, Weinstein H, Ravindranath Y, Chang MN, et al. Pharmacokinetic interactions of cyclosporine with etoposide and mitoxantrone in children with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2002;16: 920–927.
242. Shukla S, Chen ZS, Ambudkar S V. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012;15: 70–80.
243. He M, Wei MJ. Reversing multidrug resistance by tyrosine kinase inhibitors. *Chin J Cancer.* 2012;31: 126–33.
244. Anreddy N, Gupta P, Kathawala RJ, Patel A, Wurlpel JND, Chen ZS. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. *Molecules.* 2014;19: 13848–13877.
245. United HealthCare. Chemosensitivity and Chemoresistance Assays in Cancer. [https://www.unitedhealthcareonline.com/ccmcontent/ProviderII/UHC/en-US/Assets/ProviderStaticFiles/ProviderStaticFilesPdf/Tools and Resources/Policies and Protocols/Medical Policies/Medical Policies/Chemosensitivity_and_Chemoresistance_Assays.pdf](https://www.unitedhealthcareonline.com/ccmcontent/ProviderII/UHC/en-US/Assets/ProviderStaticFiles/ProviderStaticFilesPdf/Tools_and_Resources/Policies_and_Protocols/Medical_Policies/Medical_Policies/Chemosensitivity_and_Chemoresistance_Assays.pdf) (Stand: 14. Mai 2016)
246. Volm M, Efferth T. Prediction of Cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. *Front Oncol.* 2015;5: 282.
247. FDA. In Vitro Companion Diagnostic Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. *Fed Regist.* 2014; 12.

248. Barnard S, Ainsbury EA, Al-hafidh J, Hadjidekova V, Hristova R, Lindholm C, et al. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEb. *Radiat Prot Dosimetry*. 2015;164: 265–70.
249. Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V. Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*. 2007;242: 244–51.
250. Pouliliou S, Koukourakis MI. Gamma histone 2AX (γ -H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. *Biomarkers*. 2014;19: 167–80.
251. Rube CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, et al. DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;78: 359–69.
252. Schuler N, Palm J, Kaiser M, Betten D, Furtwängler R, Rube C, et al. DNA-damage foci to detect and characterize DNA repair alterations in children treated for pediatric malignancies. *PLoS One*. 2014;9.
253. Chua MLK, Rothkamm K. Biomarkers of radiation exposure: Can they predict normal tissue radiosensitivity? *Clin Oncol*. Elsevier Ltd; 2013;25: 610–616.
254. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4: 89–96.
255. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics*. 2010;5: 129–36.
256. Flassig RJ, Maubach G, Träger C, Sundmacher K, Naumann M. Experimental design, validation and computational modeling uncover DNA damage sensing by DNA-PK and ATM. *Mol Biosyst*. 2014;10: 1978–1986.
257. Poltz R, Franke R, Schweitzer K, Klamt S, Gilles ED, Naumann M. Logical network of genotoxic stress-induced NF- κ B signal transduction predicts putative target structures for therapeutic intervention strategies. *Adv Appl Bioinforma Chem*. 2009;2: 125–138.
258. Talemi SR, Jacobson T, Garla V, Navarrete C, Wagner A, Tamás MJ, et al. Mathematical modelling of arsenic transport, distribution and detoxification processes in yeast. *Mol Microbiol*. 2014;92: 1343–1356.
259. Phillips JL, Singh NP, Lai H. Electromagnetic fields and DNA damage. *Pathophysiology*. 2009;16: 79–88.
260. Grupen C. Gesetzliche Grundlagen, Empfehlungen und Richtlinien. *Grundkurs Strahlenschutz*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; pp. 89–102.
261. Yu L, Liu X, Leng S, Kofler JM, Ramirez-Giraldo JC, Qu M, et al. Radiation dose reduction in computed tomography: techniques and future perspective. *Imaging Med*. 2009;1: 65–84.
262. Nitz WR. Magnetresonanztomographie (MRT). In: Kramme R (Hrsg). *Medizintechnik*. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011. pp. 339–356.
263. Duyn JH. The future of ultra-high field MRI and fMRI for study of the human brain. *Neuroimage*. 2012;62: 1241–8.

264. Yildiz S, Cece H, Kaya I, Celik H, Taskin A, Aksoy N, et al. Impact of contrast enhanced MRI on lymphocyte DNA damage and serum visfatin level. *Clin Biochem. The Canadian Society of Clinical Chemists*; 2011;44: 975–9.
265. Sharma PM, Ponnaiya B, Taveras M, Shuryak I, Turner H, Brenner DJ. High throughput measurement of γ H2AX DSB repair kinetics in a healthy human population. *PLoS One*. 2015;10: e0121083.
266. Cohen J. *Statistical Power Analysis. Curr Dir Psychol Sci.* 2nd ed. Routledge; 1992;1: 98–101.
267. Fercher A. Wechselstrom und elektromagnetische Wellen. In: Fercher A (Hrsg). *Medizinische Physik: Physik für Mediziner, Pharmazeuten und Biologen Taschenbuch. 2., überarb Aufl.* Wien, New York: Springer; 1999. pp. 457–496.
268. Schwab SA, Brand M, Schlude I-K, Wuest W, Meier-Meitingner M, Distel L, et al. X-ray induced formation of γ -H2AX foci after full-field digital mammography and digital breast-tomosynthesis. *PLoS One*. 2013;8: e70660.
269. Beels L, Bacher K, Smeets P, Verstraete K, Vral A, Thierens H. Dose-length product of scanners correlates with DNA damage in patients undergoing contrast CT. *Eur J Radiol.* Elsevier Ireland Ltd; 2012;81: 1495–1499.
270. Grudzenski S, Kuefner MAM, Heckmann MBM, Uder M, Löbrich M. Contrast medium-enhanced radiation damage caused by CT examinations. *Radiology*. 2009;253: 706–714.
271. Pathe C, Eble K, Schmitz-Beuting D, Keil B, Kaestner B, Voelker M, et al. The presence of iodinated contrast agents amplifies DNA radiation damage in computed tomography. *Contrast Media Mol Imaging*. 2011;6: 507–513.
272. Piechowiak EI, Peter J-FW, Kleb B, Klose KJ, Heverhagen JT. Intravenous Iodinated Contrast Agents Amplify DNA Radiation Damage at CT. *Radiology*. 2015;000: 132478.
273. Cho S, Lee Y, Lee S, Choi YJ, Chung HW. Enhanced cytotoxic and genotoxic effects of gadolinium following ELF-EMF irradiation in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol*. 2014;37: 440–7.
274. Yongxing W, Xiaorong W, Zichun H. Genotoxicity of lanthanum(III) and gadolinium (III) in human peripheral blood lymphocytes. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2000;64: 611–6.
275. Broome DR. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: A summary of the medical literature reporting. *Eur J Radiol*. 2008;66: 230–234.
276. Weller A, Barber JL, Olsen ØE. Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis: an update. *Pediatr Nephrol*. 2013; 1–11.
277. Kanda T, Oba H, Toyoda K, Kitajima K, Furui S. Brain gadolinium deposition after administration of gadolinium-based contrast agents. *Jpn J Radiol.* Springer Japan; 2016;34: 3–9.
278. Rogosnitzky M, Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals.* Springer Netherlands; 2016; 1–12.
279. Ramalho J, Semelka RC, Ramalho M, Nunes RH, AlObaidy M. Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulation and Toxicity :An Update.*Am J Neuroradiol*. 2016;1–7.

-
280. Robic C, Catoen S, Goltstein De M-C, Idée J-M, Port M. The role of phosphate on Omniscan® dechelation: An in vitro relaxivity study at pH 7. *BioMetals*. 2011;24: 759–768.
 281. Heinrich MC, Kuhlmann MK, Kohlbacher S, Scheer M, Grgic A, Heckmann MB, et al. Cytotoxicity of iodinated and gadolinium-based contrast agents in renal tubular cells at angiographic concentrations: in vitro study. *Radiology*. 2007;242: 425–434.
 282. Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek H. Bioeffects of static magnetic fields: oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 602987.
 283. Liu Y, Qi H, Sun R, Chen W. An investigation into the combined effect of static magnetic fields and different anticancer drugs on K562 cell membranes. *Tumori*. 2010;97: 386–92.
 284. Norimura T, Imada H, Kunugita N, Yoshida N, Nikaido M. Effects of strong magnetic fields on cell growth and radiation response of human T-lymphocytes in culture. *J UOEH*. 1993;15: 103–12.
 285. Onodera H, Jin Z, Chida S, Suzuki Y, Tago H, Itoyama Y. Effects of 10-T static magnetic field on human peripheral blood immune cells. *Radiat Res*. 2003;159: 775–779.
 286. Aldinucci C, Garcia JB, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, et al. The effect of strong static magnetic field on lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2003;24: 109–17.
 287. Valiron O, Peris L, Rikken G, Schweitzer A, Saoudi Y, Remy C, et al. Cellular disorders induced by high magnetic fields. *J Magn Reson Imaging*. 2005;22: 334–340.
 288. Schwenzer NF, Bantleon R, Maurer B, Kehlbach R, Schraml C, Claussen CD, et al. Detection of DNA double-strand breaks using γ H2AX after MRI exposure at 3 Tesla: An in vitro study. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26: 1308–1314.
 289. Heylmann D, Rödel F, Kindler T, Kaina B. Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2014;1846: 121–9.
 290. Moquet J, Barnard S, Rothkamm K. Gamma-H2AX biodosimetry for use in large scale radiation incidents: comparison of a rapid ‘96 well lyse/fix’ protocol with a routine method. *PeerJ*. 2014;2: e282.
 291. Johansson P, Muslimovic A, Hultborn R, Fernström E, Hammarsten O. In-solution staining and arraying method for the immunofluorescence detection of γ H2AX foci optimized for clinical applications. *Biotechniques*. 2011;51: 185–189.
 292. Heylmann D, Kaina B. The γ H2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6: 22682.
 293. Winslow T. DNA Structure. <http://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/research/science/dna/DNA-structure-enlarge.jpg> (Stand: 2. April 2016)
 294. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Elektromagnetische Felder im Alltag. 2002. <http://www.systronemv.de/download/Gesamtbericht-Baden-Wuerttemberg.pdf> (Stand: 06. Feb. 2016)
 295. GSMA. Electromagnetic spectrum. <http://www.gsma.com/publicpolicy/wp-content/uploads/2012/04/electromagneticspectrum.gif> (Stand: 06. Feb. 2016)

Publikationsliste

Originalartikel

- **Willitzki A**, Lorenz S, Hiemann R, Guttek K, Goihl A, Hartig R, Conrad K, Feist E, Sack U, Schierack P, Heiserich L, Eberle C, Peters V, Roggenbuck D, Reinhold D. Fully automated analysis of chemically induced γ H2AX foci in human peripheral blood mononuclear cells by indirect immunofluorescence. *Cytom Part A*. 2013;83: 1017–1026.
- **Reddig A**, Lorenz S, Hiemann R, Guttek K, Hartig R, Heiserich L, Eberle C, Peters V, Schierack P, Sack U, Roggenbuck D, Reinhold D. Assessment of modulated cytostatic drug resistance by automated γ H2AX analysis. *Cytometry A*. 2015;87: 724–32.
- **Reddig A**, Fatahi M, Friebe B, Guttek K, Hartig R, Godenschweger F, Roggenbuck D, Ricke J, Reinhold D, Speck O. Analysis of DNA Double-Strand Breaks and Cytotoxicity after 7 Tesla Magnetic Resonance Imaging of Isolated Human Lymphocytes. *PLoS One*. 2015;10: e0132702.
- Fatahi M, **Reddig A**, Vijayalaxmi, Friebe B, Hartig R, Prihoda TJ, Ricke J, Roggenbuck D, Reinhold D, Speck O. DNA double-strand breaks and micronuclei in human blood lymphocytes after repeated whole body exposures to 7T Magnetic Resonance Imaging. *Neuroimage*. Elsevier Inc.; 2016;133: 288–293.
- **Reddig A**, Fatahi M, Roggenbuck D, Ricke J, Reinhold D, Speck O, Friebe B. Impact of in vivo high-field and ultra-high-field MRI on DNA double-strand break formation in human lymphocytes. *Radiology - in Revision*

Review

- **Willitzki A**, Hiemann R, Peters V, Sack U, Schierack P, Rödiger S, Anderer U, Conrad K, Bogdanos DP, Reinhold D, Roggenbuck D. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012: 284740.

(Erstautoren sind jeweils unterstrichen)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jene Personen würdigen, die mich in vielfältiger Weise bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben:

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dirk Reinhold. Ihm danke ich herzlichst für die Vergabe dieses interessanten Themas sowie für die stetige Unterstützung; für viele konstruktive Diskussionen, für sein Engagement, seine Motivation und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Burkart Schraven danke ich für seine jahrelange Unterstützung und die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie anfertigen zu können.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dirk Roggenbuck bedanken. Er schuf nicht nur durch die Bereitstellung des AKLIDES-Systems die Basis für diese Dissertation, sondern stand mir auch fachlich hilfreich zur Seite. Außerdem sei Dr. Peter Bauer und Dr. Lisa Heiserich, stellvertretend für das gesamte Team von Medipan, für ihre Unterstützung gedankt.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Oliver Speck und Frau Mahsa Fatahi aus der Abteilung für Biomedizinische Magnetresonanz des Instituts für Experimentelle Physik sowie Herrn Dr. med. Björn Friebe aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin für die Kooperation bei der Durchführung der MRT-Studien und den regen fachlichen Austausch.

Ein besonderer Dank gilt meiner Kollegin Karina Guttek für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und die sehr gute Zusammenarbeit sowie für die vielen guten Gespräche in allen Belangen.

Weiterhin möchte ich Herrn Alexander Goihl für seine Hilfe und die Vermittlung seines methodischen Fachwissens danken.

Herrn Dr. Roland Hartig danke ich für die methodische Einführung und seine Hilfestellungen insbesondere im Bereich der Mikroskopie und Durchflusszytometrie.

Auch allen Kollegen, die an dieser Stelle nicht namentlich genannt wurden, möchte ich herzlich danken für eine gute Zeit innerhalb und außerhalb der Institutsmauern.

Nicht zuletzt gilt meiner Familie und meinen Freunden großer Dank für die Unterstützung in den letzten Jahren. Hierbei danke ich insbesondere meinem Mann und meiner Mutter für ihre enorme Hilfe am Ende der Promotionsphase.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

„Untersuchungen zum immunzytochemischen Nachweis von
DNA-Doppelstrangbrüchen in humanen Lymphozyten
mittels automatisierter γ H2AX-Analyse“

selbständig verfasst und nicht schon als Dissertation verwendet habe sowie die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zu Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den

Annika Reddig

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird in der Online-Publikation dieser Dissertation der Lebenslauf nicht mit veröffentlicht.