

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur (FH) Ramon Lopez Perez

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2015

T h e m a

**Doppelstrangbruch-Induktion und DNA-Schadensantwort nach
¹²C-Ionen- und Photonenstrahlung in U87 Glioblastomzellen**

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Prof. Dr. Dr. Peter Huber

ZUSAMMENFASSUNG

Schwerionenstrahlung entfaltet bei gleicher physikalischer Dosis eine höhere biologische Wirksamkeit als Photonenstrahlung. In dieser Arbeit wurden die Ursachen dafür anhand der DNA-Schadensantwort in U87 Glioblastomzellen untersucht. Ausschlaggebend sind hierbei DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), deren Induktion und Reparatur durch Messung des DSB-Markers γ H2AX (phosphoryliertes Histon H2AX) im Kontext des Zellzyklus verfolgt wurde. Weiter wurde untersucht, ob es strahlenspezifische Unterschiede in der Wahl des DSB-Reparaturmechanismus gibt, und welche Folgen beim Scheitern der Reparatur eintreten. Die Untersuchungen ergaben, dass ^{12}C -Ionen-Strahlung schwerer zu reparierende DSBs erzeugt als Photonenstrahlung, die etwas verzögert und langsamer repariert werden. Dies bewirkte stärker ausgeprägte und länger anhaltende Zellzyklusblockaden, vorwiegend am G2/M-Übergang, sowie eine höhere Apoptoserate bei ^{12}C -Ionen-Strahlung. Autophagozytose als alternativer Weg des programmierten Zelltods spielte bei beiden Strahlenarten keine Rolle. Die Wirkung der ^{12}C -Ionen hing weniger stark von der Zellzyklusphase ab als bei Photonenstrahlung. Dies zeigte sich besonders deutlich anhand der DSB-Reparaturgeschwindigkeit in der S- und G2-Phase. Die Zellen waren bei ^{12}C -Ionen-Strahlung stärker auf die Reparatur durch homologe Rekombination (HRR) angewiesen als bei Photonenstrahlung.

Die Ursache dafür, dass ^{12}C -Ionen- gegenüber Photonenstrahlung schwerer zu reparierende DSBs erzeugte, die langsamer und eher durch HRR repariert wurden, war höchstwahrscheinlich eine stärkere Clusterung der DSBs aufgrund der höheren Ionisationsdichte von ^{12}C -Ionen-Strahlung. Die mikroskopische Untersuchung von immunfluoreszent markiertem γ H2AX zeigte, dass die DSB-Reparaturfoci bei ^{12}C -Ionen-Strahlung größer waren und mehr γ H2AX-Moleküle enthielten (stärkere Fluoreszenz), obwohl ihre Anzahl vor Abschluss der Reparatur geringer war. Neben den Foci wurde auch ein schwächeres pan-nukleäres γ H2AX-Signal beobachtet, das linear mit der Strahlendosis anstieg und bei ^{12}C -Ionen-Strahlung stärker ausgeprägt war als bei Photonenstrahlung. Pan-nukleäres γ H2AX als Folge von ionisierender Strahlung wird mit kleinen DNA-Fragmenten in Zusammenhang gebracht. Diese Indizien sprachen dafür, dass die Clusterung der DSBs, und nicht allein ihre Anzahl, ausschlaggebend für die hohe relative biologische Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen-Strahlung ist.

Weitere Hinweise auf geclusterte DSBs nach ^{12}C -Ionen-Strahlung lieferten Untersuchungen der Reparaturfoci nach Immunfärbung von γ H2AX und dem HRR-Enzym pBRCA1 mit Hilfe supraauflösender Mikroskopie. Hierzu wurden die Zellen mit einzelnen bis einigen wenigen ^{12}C -Ionen unter einem flachen Winkel bestrahlt. Durch Einsatz von strukturierter Beleuchtung (SIM) gelang es die Foci und ihren Kolokalisationsgrad im Verlauf der Reparatur mit einer hohen Genauigkeit jenseits der klassischen Auflösungsgrenze in 3D zu vermessen. Neben den primär entlang der Ionenflugbahn induzierten Foci traten nach 26 h neue Sekundärfoci auf. Diese waren abweichend von der Ionenflugbahn verteilt und gingen vermutlich im Zuge der DNA-Replikation aus verbleibenden Nicht-DSB-Schäden hervor. In Übereinstimmung mit der Abhängigkeit solcher Sekundärfoci von der Reparatur durch Bruch-induzierte

Replikation, einer Sonderform der HRR, wiesen die sekundären γ H2AX Foci einen besonders hohen Kollokalisationsgrad mit pBRCA1 auf. Die innere Struktur der γ H2AX Foci wurde mit SPDM_{phymod}, einer weiteren supraauflösenden Mikroskopietechnik untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Foci, die Größen bis über $1,5\mu\text{m}^3$ erreichen, nicht homogen aufgebaut sind, sondern über eine feine Substruktur verfügen. Demnach bestehen die Foci aus vielen Subfoci in der Größenordnung von 100 nm mit teilweise länglicher Gestalt. Passend zur Organisation des Chromatins in dicht gepackten Schlaufen mit Interchromatin-Lücken ließen sich unterschiedliche Verläufe und Abstände zwischen den Subfoci erkennen.

SUMMARY

Heavy ion radiation has greater biological effectiveness than the same physical dose of photon radiation. In this work the underlying reasons in the DNA damage response were analyzed in U87 glioblastoma cells. DNA double-strand breaks (DSBs) are the decisive lesions for the effectiveness of ionizing radiation. Their induction and repair was measured in the context of the cell cycle based on the DSB marker γ H2AX (the phosphorylated form of the histone variant H2AX). Further, radiation-specific differences in choice of the DSB repair pathway was analyzed, as well as the consequences of repair failure. The results showed that in contrast to photons, ^{12}C ion radiation produces more severe DSBs that are repaired delayed and with slower kinetics. Accordingly, stronger and longer lasting cell cycle delays, predominantly at the G2/M border, and a higher rate of apoptosis was detected for ^{12}C ion radiation. Autophagy, an alternative mechanism of programmed cell death, was not relevant for neither of the two types of radiation. The effect of ^{12}C ion radiation was less dependent on the cell cycle stage than for photon radiation. This became particularly evident in the DSB repair velocities during S- and G2-phase. After ^{12}C ion radiation, cells were more dependent on homologous recombination repair (HRR) compared to photon radiation.

The reason therefore that in contrast to photons, ^{12}C ion radiation induced graver DSBs that were repaired slower and more dependent on HRR, was most probably enhanced clustering of DSBs due to the higher ionization density of ^{12}C ion radiation. Microscopic inspection of immunofluorescently stained γ H2AX revealed that ^{12}C ion radiation induced bigger DSB repair foci containing more γ H2AX molecules (higher fluorescence intensity), although their initial number was smaller. Besides the foci, a weaker pan-nuclear γ H2AX staining was observed that increased in a dose-dependent manner and was more pronounced for ^{12}C ion compared to photon radiation. Pan-nuclear γ H2AX caused by ionizing radiation can be linked to the induction of small DNA fragments. These results indicated that the clustering of DSBs, rather than their sheer number, is decisive for the high relative biological effectiveness of ^{12}C ion radiation.

Further hints for clustered DSBs after ^{12}C ion radiation were found by application of super-resolution microscopy to analyze repair foci after immunofluorescent staining of γ H2AX and the HRR enzyme pBRCA1. Therefore, cells were irradiated with individual or only few ^{12}C ions under a flat angle. With the help of structured illumination microscopy (SIM), the foci and their colocalization could be measured with high accuracy beyond the classical resolution limit in 3D. Besides primary foci induced along the ion trajectory, new secondary foci appeared after 26 h. They were scattered offside the ion track and were presumably caused by unrepaired non-DSB lesions in the course of DNA replication. In accordance with the dependency of such secondary DSBs on repair by break-induced replication, a HRR subpathway, colocalization between γ H2AX and pBRCA1 was particularly high in the secondary foci. The inner structure of γ H2AX foci was further analyzed with SPDM_{PhyMod}, another super-resolution microscopy technique. This revealed that the foci, that can reach sizes up to more

than $1,5\mu\text{m}^3$, possess a fine substructure rather than being homogenous. The results indicated that the foci are composed of several subfoci in the range of 100 nm with partially elongated shape. In accordance with the organization of chromatin in densely packed loops with interchromatin spaces, different structures and distances between the subfoci could be observed.

VORWORT

Die vorliegende Arbeit ist in Kooperation mit den folgenden Arbeitsgruppen und Instituten entstanden:

- Klinische Kooperationseinheit Molekulare Radioonkologie (DKFZ, Prof. Dr. Dr. Peter E. Huber) und Strahlentherapie (Universitätsklinikum Heidelberg, Prof. Dr. Klaus-Josef Weber)
- Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (Universitätsklinikum Heidelberg)
- AG DNA Repair and Epigenomics (Dr. Peter Schmezer), Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren (DKFZ, Prof. Dr. Christoph Plass)
- AG Biophysik der Genomstruktur, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (Universität Heidelberg, Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer)
- Institut für Angewandte Physik und Messtechnik (Universität der Bundeswehr München, Prof. Dr. Günther Dollinger)
- AG Strahlenbiologie, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Klinikum der Universität München, PD Dr. Anna Friedl)

Ich bedanke mich an dieser Stelle herzlich bei allen Beteiligten für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit, die diese Dissertation erst ermöglicht haben.

Die Etablierung und Weiterentwicklung von Methoden stellte einen wesentlichen Teil dieser Doktorarbeit dar; einige Methoden waren zu Beginn nicht in den Arbeitsgruppen verfügbar, einige wurden erweitert oder vollkommen neu entwickelt. Dies betrifft insbesondere die Auswertung der gewonnenen Daten mit Hilfe von neu implementierten Softwarelösungen. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, gibt es neben dem Kapitel *Materialien und Standardmethoden* ein separates Kapitel *Methodenentwicklung*. Es beschreibt und begründet die systematische Entwicklung der Methoden anhand von Ergebnissen aus Vorversuchen. Im Kapitel *Ergebnisse* werden die Hauptversuche beschrieben, welche mit den erarbeiteten Protokollen durchgeführt wurden.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Prof. Peter Huber dafür, dass er mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Er vertraute mir die Planung der Arbeit in weiten Teilen an und ließ mir viel Freiraum bei der Umsetzung. Dennoch war er stets für mich da, wenn ich Hilfe brauchte. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung mit Rat und Tat!

Vielen Dank auch an Prof. Christoph Cremer, für die großartige Möglichkeit zur Anwendung der supraauflösenden Mikroskopie auf dem Gebiet der strahlenbiologischen Forschung. Prof. Cremer bewies nicht nur ein Auge für das aller Kleinste, sondern auch viel Weitblick für das große Ganze.

In diesem Zuge möchte ich mich außerdem bei Dr. Manuel Gunkel, Dr. Rainer Kaufmann und Dr. Gerrit Best bedanken, die ich als Kollegen in der AG Cremer kennengelernt habe und seitdem auch als Freunde schätze. Sie führten in die Welt der supraauflösenden Mikroskopie ein und halfen mir bei zahlreichen Bildanalysen. Besonders möchte ich Gerrit Best danken, der mich vieles über wissenschaftliche Bildverarbeitung lehrte und der Fourier-Transformation ein wenig von ihrem Schrecken nahm.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Patrick Müller und Prof. Michael Hausmann, für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die von unschätzbarem Wert für die Interpretation einiger Ergebnisse waren.

Vielen Dank an Dr. Peter Schmezer und Prof. Klaus-Josef Weber, die mich neben Prof. Huber und Prof. Cremer im Rahmen meines thesis advisory committees beraten haben und mir Halt und wichtige Impulse bei der Projektplanung gaben.

Ich bedanke mich für die gute Zusammenarbeit bei der AG Schmezer und insbesondere bei Otto Zelezny und Reinhard Gliniorz.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen Dr. Christin Glowa und Dr. Maria Saager bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, sowie bei Thomas Regiert, Sylvia Trinh, Dr. Ute Wirkner und Alexandra Tietz-Dalfuß für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Dr. Nils Nicolay danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit. Sein feines redaktionelles Gespür hat wesentlich zur Qualität dieser Dissertation beigetragen. Außerdem bedanke ich mich bei Carolin Lange, die mir einen großen Dienst als Lektorin erwiesen hat.

Meinen Eltern bin ich unermesslich dankbar, dass sie stets an mich geglaubt und mich unentwegt unterstützt und gefördert haben. Auch meinen Schwiegereltern möchte ich danken, vor allem für die Unterstützung während der Fertigstellung dieser Dissertation.

Zu guter Letzt möchte ich mich für die große Geduld und das Verständnis, das eine Doktorarbeit ab und zu einfordert, bei meiner Ehefrau Stephanie bedanken. Ihr und unserer Tochter Elena widme ich diese Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einführung	1
1.1.	Ionisierende Strahlung	1
1.1.1.	Dosisbegriffe	2
1.1.2.	Wechselwirkungen ionisierender Photonenstrahlung	3
1.1.3.	Wechselwirkungen von Schwerionenstrahlung	7
1.2.	Strahlentherapie	7
1.2.1.	Klinische Relevanz der Teilchentherapie	8
1.2.2.	Die Phasen der biologischen Wirkung ionisierender Strahlung	9
1.3.	DNA-Schäden	11
1.3.1.	DNA-Doppelstrangbrüche	11
1.4.	Die DNA-Schadensantwort	12
1.4.1.	Schadenserkennung und Signalverstärkung	13
1.4.2.	Weiterleitung von Schadenssignalen	15
1.4.3.	γ H2AX als DSB-Marker	16
1.5.	DNA-Reparatur	17
1.5.1.	DSB-Reparatur	18
1.5.2.	Basenexzisionsreparatur	22
1.5.3.	Nukleotidexzisionsreparatur	23
1.5.4.	Fehlpaarungsreparatur	25
1.5.5.	Weitere Reparaturmechanismen	27
1.5.6.	Fehlertoleranz	27
1.6.	Biologische Spätfolgen von DNA-Schäden	28
1.6.1.	Apoptose	28
1.6.2.	Autophagozytose	31
1.6.3.	Seneszenz	33
1.7.	Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie	34
1.7.1.	Lokalisationsmikroskopie (SPDM _{phy} mod)	37
1.7.2.	Strukturierte Beleuchtung	38
2.	Materialien und Standardmethoden	40
2.1.	Allgemeine Laborgeräte	40
2.2.	Zellkultur	40
2.2.1.	Geräte	40
2.2.2.	Medien	41
2.2.3.	Verbrauchsmaterialien	41
2.2.4.	Zellen	41
2.2.5.	Kultivierung von U87 Zellen	42
2.2.6.	Wachstumskurve U87	42
2.2.7.	Kultivierung von MRC-5 Zellen	43
2.3.	Bestrahlung	43
2.3.1.	Dosimetrie	45
2.4.	Proteinanalyse	47
2.4.1.	Geräte	47
2.4.2.	Materialien	47
2.4.3.	Lösungen	48
2.4.4.	Proteinaufreinigung	49
2.4.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	49

2.4.6.	SDS-PAGE	50
2.4.7.	Western Blot	50
2.5.	Immunfluoreszenz-Färbungen für Mikroskopie und FACS	52
2.5.1.	Geräte	52
2.5.2.	Materialien	52
2.5.3.	Lösungen	53
2.5.4.	Mikroskopie	53
2.5.5.	Durchflusszytometrie	55
2.6.	Datenerhebung und statistische Auswertung	55
3.	Methodenentwicklung	57
3.1.	Durchflusszytometrie	57
3.1.1.	Berücksichtigung von Zellzyklus und Apoptose	57
3.1.2.	Erweiterte Apoptose-Messung	60
3.1.3.	Erweiterte Zellzyklus-Messung	63
3.1.4.	Das vollständige Protokoll	64
3.1.5.	Datenauswertung	65
3.2.	HCS Mikroskopie	67
3.2.1.	Protokollabwandlungen der Immunfärbung und ihr Einfluss auf die Messergebnisse	68
3.2.2.	Das optimierte Protokoll	70
3.2.3.	Datenauswertung	70
3.3.	Kombination von Durchflusszytometrie und HCS Mikroskopie	71
3.4.	Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie	71
3.4.1.	Einfluss verschiedener Eindeckmedien auf das Bleich- und Blinkverhalten der Fluorophore	73
3.4.2.	Optimierung und Erweiterung der Immunfluoreszenz-Färbung	74
3.4.3.	Das optimierte Protokoll	74
3.4.4.	Aufnahmesequenz am SIM-SPDM Kombimikroskop	76
3.4.5.	Auswertealgorithmen	78
3.4.6.	Entfaltung der 3D-Weitfeld-Aufnahmen	78
3.4.7.	Auswertung der SIM-Aufnahmen	79
3.4.8.	Auswertung der SPDM-Aufnahmen	84
3.4.9.	Überlagerung von SIM und SPDM Bildern	87
3.4.10.	Ergebnisse aus methodischer Sicht	89
4.	Ergebnisse	91
4.1.	Dosis-Wirkung von ¹² C-Ionen- und Photonenstrahlung	91
4.1.1.	Die relative Wirksamkeit von ¹² C-Ionen variiert mit der Zellzyklusphase und der Dosis	91
4.1.2.	¹² C-Ionen und Photonen verursachen qualitativ unterschiedliche DSB-Foci	94
4.1.3.	γH2AX kommt nicht ausschließlich in DSB-Foci vor, sondern auch pan-nukleär	99
4.2.	Folgen von ¹² C-Ionen- und Photonenstrahlung im Zeitverlauf	101
4.2.1.	DSBs durch Photonen werden effizienter repariert als ¹² C-Ionen-induzierte	101
4.2.2.	Unterschiede in der Reparaturkinetik hängen wahrscheinlich mit der Qualität der DSB-Foci zusammen	106
4.2.3.	Homologe Rekombination spielt bei ¹² C-Ionen-Strahlung eine besonders wichtige Rolle für die DSB-Reparatur	106
4.2.4.	¹² C-Ionen verursachen stärkere und länger anhaltende Zellzyklusblockaden als Photonen	109
4.2.5.	¹² C-Ionen lösen Apoptose effizienter aus als Photonen	114
4.2.6.	Autophagozytose spielt keine Rolle für die Strahlenantwort in U87 Zellen	116
4.3.	Struktur von DSB-Reparaturfoci nach Schrägbestrahlung mit ¹² C-Ionen	118
4.3.1.	Im Zeitverlauf zeigen sich primäre und sekundäre DSB-Reparaturfoci	118
4.3.2.	Foci Substruktur	123
5.	Diskussion	127
5.1.	DSBs, γH2AX und relative Wirksamkeit	127
5.2.	DSB-Reparatur und Schadenskomplexität	131
5.3.	Irreparable DSBs und ihre Spätfolgen	133

5.4.	Neue Erkenntnisse zur Feinstruktur von DSB-Reparaturfoci durch supraauflösende Mikroskopie	133
5.4.1.	Sekundärfoci tragen zur Wirkung von ¹² C-Ionen bei	134
5.4.2.	γH2AX-Foci bestehen aus vielen kleineren Subfoci	136
5.4.3.	¹² C-Ionen verursachen H2AX- und BRCA1-Phosphorylierung auch abseits ihrer Flugbahn	137
5.5.	Potenzielle Schlussfolgerungen für die klinische Strahlentherapie mit Schwerionen . . .	138
A. Anhang		142
A.1.	MATLAB Algorithmen	142
A.1.1.	Allgemeine Funktionen	142
A.1.2.	Funktionen für 3D-Weitfeldbilder	150
A.1.3.	Funktionen für SIM-Aufnahmen	152
A.1.4.	Funktionen für SPDM-Aufnahmen	161
A.1.5.	Funktionen zur Kombination von SIM- und SPDM-Aufnahmen	168
A.2.	Fits der DSB-Reparaturkinetik in Abschnitt 4.2.1	169
A.3.	Analyse der Signaldistanzen in den SPDM-Daten aus Abschnitt 4.3.2 im Vergleich zu Zufallsverteilungen	172
Literaturverzeichnis		I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1.	Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung	2
1.2.	Klassische Streuung	4
1.3.	Fotoionisation	4
1.4.	Comptonstreuung	5
1.5.	Paarbildung	6
1.6.	Kernfotoeffekt	6
1.7.	Dosisprofile von Photonen-, Protonen- und ^{12}C -Ionen-Strahlung	8
1.8.	Biologische Folgen ionisierender Strahlung	10
1.9.	Schadenserkennung und Signalverstärkung	14
1.10.	Einleitung von Zellzyklusblockaden	16
1.11.	Transkriptionales Netzwerk von p53	17
1.12.	Nicht-homologe End-zu-End Verbindung	19
1.13.	Homologe Rekombination	20
1.14.	Basenexzisionsreparatur	23
1.15.	Nukleotidexzisionsreparatur	24
1.16.	Fehlpaarungsreparatur	26
1.17.	Apoptose	30
1.18.	Makroautophagozytose	33
1.19.	PSF und mikroskopischen Abbildung.	35
1.20.	Moiré-Effekt	38
1.21.	SIM-Prinzip	39
2.1.	Wachstum von U87 Zellen	43
2.2.	Bestrahlungsanordnungen	44
2.3.	Einfluss der Bestrahlungsanordnung auf das γH2AX -Signal (FACS-Messung)	46
2.4.	Aufbau der Blot-Anordnung	51
2.5.	HCS Mikroskop (MetaSystems)	54
3.1.	FACS-Fixierung: Einfluss auf die Zellzyklusmessung	59
3.2.	FACS-Fixierung: Einfluss auf das γH2AX -Signal	60
3.3.	Validierung des Casp3*-AK	62
3.4.	Abtrennung von Zelltrümmern und -haufen zur korrekten Zellzyklus- und subG1-Analyse	63
3.5.	Validierung der subG1-Messung	64
3.6.	FACS-Auswertung: Unterteilung der Subpopulationen	66
3.7.	HCS-Mikroskopie: Einfluss von Protokollabwandlungen auf die Zellkerngröße	68
3.8.	HCS-Mikroskopie: Einfluss von Protokollabwandlungen auf die γH2AX -Färbung	69
3.9.	Aufbau des SIM-SPDM Kombimikroskops	72
3.10.	Optimierung der Immunfärbung für 3D-SIM	75
3.11.	Kontrolle von Signalüberlappungen bei der SIM-Aufnahme	76
3.12.	SIM Beleuchtungsmuster und Aufnahmesequenz	77
3.13.	Flussdiagramm zur Auswertung von SIM-Aufnahmen	80
3.14.	SIM Bleichkorrektur	82
3.15.	Probendrift während einer SIM-Aufnahme	84
3.16.	Flussdiagramm zur Auswertung von SPDM-Aufnahmen	85
3.17.	Driftkorrektur für Lokisationsaufnahmen	86
3.18.	Auflösungsverbesserung durch 3D-SIM	89

3.19.	Auflösungsverbesserung durch SIM und SPDM	90
4.1.	Klonogenes Überleben	91
4.2.	Dosis-Wirkung von Photonen und ^{12}C -Ionen: Zellzykluspezifische γH2AX -Fluoreszenz	92
4.3.	Zellzyklusanalyse 30 min nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	93
4.4.	Beispielaufnahmen der HCS Mikroskopie	94
4.5.	Dosis-abhängige Eigenschaften der γH2AX -Färbung 30 min nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	95
4.6.	Verteilung der γH2AX Fokusanzahl/Zellkern bei gleicher Dosis Photonen oder ^{12}C -Ionen	96
4.7.	Verteilung der mittleren γH2AX Fokusfläche bei gleicher Dosis Photonen oder ^{12}C -Ionen	97
4.8.	Dosis-abhängige Eigenschaften der γH2AX -Färbung 30 min nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen	98
4.9.	Dosis-abhängige Verteilung der Anzahl an γH2AX Foci pro Zellkern nach ^{12}C -Ionen-Bestrahlung	98
4.10.	NN4-Distanzen der γH2AX -Signale nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SPDM)	100
4.11.	Reparaturkinetik nach 1 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen: Zellzykluspezifische γH2AX -Fluoreszenz	102
4.12.	Reparaturkinetik nach 4 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen: Zellzykluspezifische γH2AX -Fluoreszenz	103
4.13.	Kenngrößen der DSB-Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	105
4.14.	Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen: γH2AX Foci	107
4.15.	DSB-Reparatur durch HRR nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	108
4.16.	Zellzyklusanalyse nach 1 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen	110
4.17.	Zellzyklusanalyse nach 4 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen	111
4.18.	Veränderungen der Zellkerngröße nach 1 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen	112
4.19.	Veränderungen der Zellkerngröße nach 4 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen	113
4.20.	Zellzyklus-Regulation nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	114
4.21.	Apoptose nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	115
4.22.	Zellzyklusanalyse der Casp3 ⁺ Zellen	116
4.23.	Autophagozytose nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen	117
4.24.	Schnittbilder von γH2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SIM)	119
4.25.	3D Ansichten von γH2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SIM)	120
4.26.	Größe und Form von γH2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SIM)	121
4.27.	Eigenschaften der γH2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SIM)	122
4.28.	Kolokalisation von γH2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf (SIM)	122
4.29.	Zellkern- und DNA-Volumen nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen	123
4.30.	Innere Struktur der γH2AX Foci.	124
4.31.	SPDM-basierte Clusteranalyse der γH2AX -Signale nach Schrägbestrahlung	125
4.32.	Eigenschaften der γH2AX Subfoci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SPDM)	126
A.1.	Distanzen von γH2AX -Signalen in SPDM-Daten im Vergleich zu Zufallsverteilungen	172

TABELLENVERZEICHNIS

1.1. Superauflösende Mikroskopietechniken	36
2.1. Kenngrößen der eingesetzten Strahlenquellen	45
3.1. Einstellungen des LSR II Durchflusszytometers	65
3.2. Kompensationsmatrix	66
3.3. Protokollabwandlungen der Immunfärbung für HCS Mikroskopie	68
3.4. Bleich- und Blinkverhalten zweier Fluorophore in verschiedenen Eindeckmedien	73
3.5. Aufnahmesequenz am SIM-SPDM Kombimikroskop	77
3.6. Algorithmenübersicht	79

ABKÜRZUNGEN

1°AK	Primärantikörper	Chk1	Checkpoint kinase 1
2°AK	Sekundärantikörper	Chk2	Checkpoint kinase 2
3D	Dreidimensional	CSA	Cockayne Syndrome-A
ABRA1	BRCA1-A complex subunit Abraxas	CSB	Cockayne Syndrome-B
Acinus	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	CtIP	CtBP-interacting protein (<i>auch</i> DNA endonuclease RBBP8, Retinoblastoma-binding protein 8)
AcOH	Essigsäure, bzw. Acetat	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
AIF	Apoptosis-inducing factor 1	DDB 1	DNA damage-binding protein 1
Akt	Proteinkinase B	DDB 2	DNA damage-binding protein 2
AMP	Adenosinmonophosphat	DFFA	DNA fragmentation factor subunit α
AP	Basenfehlstelle (<i>engl.</i> apurinic <i>od.</i> apyrimidinic site)	DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
APE-1	AP endonuclease 1 (<i>auch</i> DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase)	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
APS	Ammoniumpersulfat	DMSO	Dimethylsulfoxid
ATCC	American Type Culture Collection	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
ATG	Adenosintriphosphat	Dna2	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein	DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-PK (<i>engl.</i> DNA-PK catalytic subunit)
ATRIP	ATR-interagierendes Protein	DSB	DNA-Doppelstrangbruch
BER	Basenexzisionsreparatur	DTT	Dithiothreitol
BIR	Bruch-induzierte Replikation	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
BLM	Bloom syndrome protein	EME1	Crossover junction endonuclease EME1
B-NHEJ	Backup-NHEJ	EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	Endo G	Endonuklease G
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein	ER	Endoplasmatisches Retikulum
BSA	bovines Serumalbumin	ERCC1	DNA excision repair protein ERCC-1
CAD	Caspase-aktivierte DNase (<i>auch</i> DNA fragmentation factor subunit β , <i>kurz</i> DFFB)	Exo1	Exonuklease 1
Casp3*	Aktivierte Caspase-3	FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> fluorescence activated cell sorting)
CERN	Conseil Européen pour la Recherche Nucléaire (Europäische Organisation für Kernforschung)	FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
CDKs	Cyclin-abhängige Kinasen (<i>engl.</i> cyclin-dependent kinases)	FADD	Fas-associated death domain protein
		FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)

Abkürzungen

FasL	Fas antigen ligand	Mre11	Meiotic recombination 11 homolog A (auch double-strand break repair protein MRE11A)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>engl.</i> fetal calf serum)	MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 (Proteinkomplex)
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa (auch RB1-inducible coiled-coil protein 1)	MSH2	MutS protein homolog 2
GEN1	Flap endonuclease GEN homolog 1	MSH3	MutS protein homolog 3
GG-NER	global genome NER	mTOR	Mechanistic target of rapamycin
GSI	GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung (<i>früher</i> Gesellschaft für Schwerionenforschung)	MutL α	hMLH1-hPMS2-Heterodimer
γ H2AX	Phospho-H2AX (Ser139)	MutS α	hMSH2-hMSH6-Heterodimer
H2AX	Histon H2AX	MutS β	hMSH2-hMSH3-Heterodimer
HCS	high content screening	Mus81	Crossover junction endonuclease MUS81
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	NA	Numerische Apertur
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum	NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> horseradish peroxidase)	NBS1	Nibrin (auch Nijmegen breakage syndrome protein 1, cell cycle regulatory protein p95)
HRR	DSB-Reparatur durch Homologe Rekombination (<i>engl.</i> homologous recombination repair)	NER	Nukleotidexzisionsreparatur
Hsc70	heat shock cognate 71 kDa protein	NF	Niederfrequenz
HZDR	Helmholtzzentrum Dresden-Rossendorf	NHEJ	Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung
IgG	Immunglobulin G	OTF	Optische Übertragungsfunktion (<i>engl.</i> optical transfer function)
JNK1	c-Jun N-terminale Kinase	p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
KAP-1	KRAB-associated protein 1 (auch transcription intermediary factor 1-beta, <i>kurz</i> TIF1- β)	p53	Cellular tumor antigen p53
KDF	Khoros Datenformat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
LAMP-2A	Lysosome-associate membrane protein 2A	PALB2	Partner and localizer of BRCA2
LHC	Großer Hardronen-Speicherring (<i>engl.</i> Large Hardron Collider)	PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
Lig I	DNA-Ligase I	pBRCA1	Phospho-BRCA1 (Ser1524)
Lig III	DNA-Ligase III	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline), Formulierung nach Dulbecco
Lig IV	DNA-Ligase IV	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
LinAc	Linearbeschleuniger (<i>engl.</i> linear accelerator)	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
MCM	minichromosomal maintenance Komplex	pH3	Phospho-Histon H3 (Ser10)
MCPH1	Microcephalin	PI	Propidiumiodid
MLH1	MutL protein homolog 3	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
MMR	Fehlpaarungsreparatur (<i>engl.</i> mismatch repair)	PMS2	PMS1 protein homolog 2
		Pol II	RNA-Polymerase II
		Pol β	DNA-Polymerase β
		Pol δ	DNA-Polymerase δ
		Pole	DNA-Polymerase ϵ

Pol λ	DNA-Polymerase λ	TLS	Translesion synthesis
pRad52	Phospho-Rad52 (Tyr104)	TNF- α	Tumornekrosefaktor
PVDF	Polyvinylidenfluorid	TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
PSF	Punktbildfunktion (<i>engl.</i> point-spread function)	TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>engl.</i> TNF-related apoptosis-inducing ligand)
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Rad50	DNA repair protein RAD50	Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Rad51	DNA repair protein RAD51 homolog 1	Ubc13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
Rad52	DNA repair protein RAD52 homolog	ULK1	Unc-51-like kinase 1 (<i>auch</i> Atg1)
RAP80	BRCA1-A complex subunit RAP80 (<i>auch</i> receptor-associated protein 80)	ÜN	Über Nacht
RBW	Relative biologische Wirksamkeit	ÜS	Überstand
RDW	Relative dosisäquivalente Wirksamkeit	UV	Ultraviolett
RFC	Replication factor c	UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht (200–1100 nm Wellenlänge)
RöV	Verordnung über den Schutz vor Schäden durch Röntgenstrahlen (Röntgenverordnung)	V(D)J	Variable diversity joining
RNA	Ribonukleinsäure (<i>eng.</i> ribonucleic acid)	WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
RNase	Ribonuklease	XLF	XRCC4-like factor (<i>auch</i> non-homologous end-joining factor 1, Cernunnos)
RNF8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF8 (<i>auch</i> RING finger protein 8)	XPA-XPG	Xeroderma pigmentosum group A-G complementing protein
RPA	Replication protein A	XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1 (<i>auch</i> DNA repair protein XRCC1)
RT	Raumtemperatur	XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4 (<i>auch</i> DNA repair protein XRCC4)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)		
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese		
SI	Système International d'Unités		
SIM	Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (<i>engl.</i> structured illumination microscopy)		
SLX1	Structure-specific endonuclease subunit SLX1		
SLX4	Structure-specific endonuclease subunit SLX4		
SOBP	Spread-out Bragg-Peak		
SPDM	Spectral precision distance microscopy		
StrlSchV	Verordnung über den Schutz vor Schäden durch ionisierende Strahlen (Strahlenschutzverordnung)		
TC-NER	Transcription-coupled NER		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
Tip60	60 kDa Tat-interactive protein (<i>auch</i> histone acetyltransferase KAT5)		

1.1. Ionisierende Strahlung

Als *Strahlung* bezeichnet man allgemein die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Teilchen oder Wellen und den damit verbundenen Energietransport. Im engeren Sinne versteht man unter *Teilchenstrahlung* (auch *Partikelstrahlung* oder *Korpuskelstrahlung* genannt) den Transport von energiereichen Atomen, Ionen, Elektronen oder anderen Elementarteilchen, die eine von Null verschiedene Ruhemasse besitzen. Im Gegensatz dazu steht die *Wellenstrahlung*, die den Transport von Energie ohne Übertragung von Teilchen mit eigener Masse meint. Im Wesentlichen wird darunter jede Form der *elektromagnetischen Strahlung* verstanden, bei der im Sinne des Welle-Teilchen-Dualismus *Photonen*, die Quanten des elektromagnetischen Felds die Energie transportieren.

Übersteigt die Energie der strahlenden Photonen oder Masseteilchen einige Elektronenvolt, so spricht man von *ionisierender Strahlung*¹, da die Energie ausreicht, um Elektronen aus der Atomhülle zu schlagen, so dass ein geladenes Ion zurückbleibt. Die minimale Ionisationsenergie entspricht der Bindungsenergie der Valenzelektronen eines einzelnen Atoms oder Moleküls und beträgt typischerweise etwa 15 eV [1]. Im Wasser oder innerhalb von menschlichem Gewebe sind etwa 30 eV für eine Ionisation erforderlich. Kurzwelliges ultraviolettes (UV) Licht liegt an der Grenze zu diesem Energiebereich. Für die *Strahlentherapie* ist jedoch nur ionisierende Strahlung ab 10 keV von Bedeutung, also Röntgen- und γ -Strahlung (bis 50 MeV [2]) oder noch energiereichere Teilchenstrahlung. Zur Einordnung zeigt Abbildung 1.1 das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung anhand ihrer verschiedenen Erscheinungsformen und Energiebereiche.

Zur Teilchenstrahlung zählen α - und β -Strahlung, die bei radioaktiven Zerfallsprozessen (dem α -, beziehungsweise β -Zerfall) entstehen, sowie *Protonenstrahlung* und *Schwerionenstrahlung*, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Bei der β -Strahlung handelt es sich um freie Elektronen (β^- -Zerfall) oder Positronen (β^+ -Zerfall), bei α -Strahlung um schnelle ^4He -Kerne, also strahlende Heliumionen. Strahlende Ionen mit höheren Massenzahlen als Helium werden als *Schwerionen* bezeichnet.

Besonders energiereiche Schwerionen finden sich im Spektrum der *kosmischen Strahlung*. Sie können Energien von einigen GeV (typisch für Sonneneruptionen), bis hin zu über 10^{19} eV (seltene extragalaktische Teilchen) erreichen [3]. Häufig handelt es sich um C-, O-, Ne-, Mg-, Si- und Fe-Ionen (geradzahlige Massenzahlen kommen häufiger vor als ungerade). Die meisten kosmischen Schwerionen können nicht bis zur Erdoberfläche vordringen. Sie werden durch das Erdmagnetfeld abgelenkt oder in der Atmosphäre absorbiert, wo sie in einer Kaskade von Wechselwirkungen (siehe Abschnitt 1.1.3) Teilchenschauer erzeugen (*Höhenstrahlung*).

¹im Strahlenschutz wird Strahlung ab 5 keV als ionisierend festgelegt (§ 1 RöV, § 2 StrlSchV). Dies hat jedoch rein administrative Gründe und entspricht keinen tatsächlichen Ionisationsenergien.

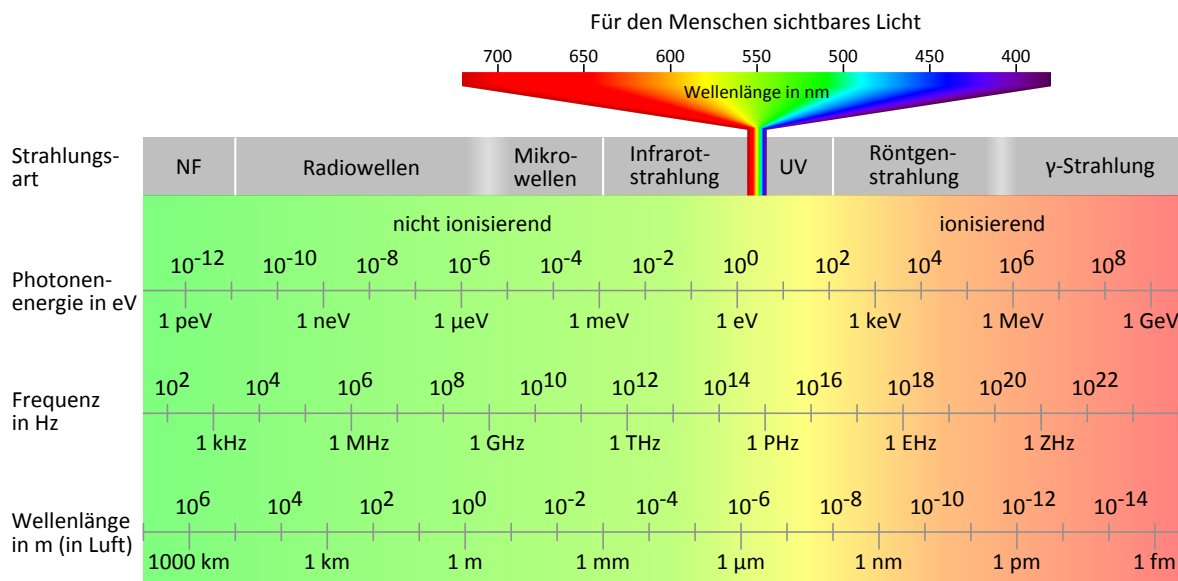


Abbildung 1.1. | Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung erstreckt sich von niederfrequenter Strahlung (NF) durch Wechselströme und Radiowellen, die für den Rundfunk genutzt werden, über Mikrowellen, Infrarot-Strahlung, das sichtbare und ultraviolette (UV) Licht, bis hin zu energiereichen ionisierenden Strahlungsarten, wie Röntgen- und γ -Strahlung.

Künstlich kann Schwerionenstrahlung durch Beschleunigung der Ionen in einem Teilchenbeschleuniger erzeugt werden. Die elektrisch geladenen Ionen werden dabei von elektrischen Feldern auf sehr hohe Geschwindigkeiten gebracht und ihre Flugrichtung wird durch starke Magnetfelder kontrolliert.

1.1.1. Dosisbegriffe

Wie viel Energie Strahlung in Materie einträgt hängt sowohl von der Strahlung selbst, als auch den Eigenschaften der Materie ab. Das physikalische Maß für die gesamte Energieabsorption in einer Masse ist die *Energiedosis*, oder kurz *Dosis*, und wird nach dem SI-Einheitensystem in *Gray* (Gy) gemessen:

$$1\text{Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$$

In einem lebenden Organismus können verschiedene Strahlenarten, trotz gleicher Energiedosis, unterschiedlich starke biologische Wirkungen entfalten. Die Toxizität ist zum Beispiel abhängig vom Wirkungsquerschnitt der Strahlung, der bei Schwerionenstrahlung wesentlich kleiner ist als bei Photonenstrahlung (siehe Abschnitt 1.1.3). Um dem Rechnung zu tragen sind in der Radiologie gewichtete Dosisgrößen definiert. Sie werden als *Äquivalentdosen* angegeben, bei denen die gleiche Wirkung eintritt wie für eine gegebene Energiedosis einer Referenzstrahlung. Äquivalentdosen berechnen sich durch Multiplikation der Referenzdosis mit einem dimensionslosen *Strahlungswichtungsfaktor*, der die *relative biologische Wirksamkeit* (RBW) angibt:

$$RBW = \frac{D_{ref}}{D_u} \quad \begin{array}{l} RBW \text{ Relative biologische Wirksamkeit} \\ D_{ref} \text{ Energiedosis der Referenzstrahlung} \\ D_u \text{ Äquivalentdosis der untersuchten Strahlung} \end{array} \quad (1.1)$$

Im Strahlenschutz dient gewöhnlich 250 keV Röntgenstrahlung oder γ -Strahlung aus einer ^{60}Co Quelle als Referenzstrahlung und die Äquivalentdosen werden zur Unterscheidung von ungewichteten Energiedosen in der Einheit *Sievert* (Sv) angegeben (meist als mSv oder μSv). Wie das Gy hat Sv die Basiseinheit Joule pro Kilogramm, weil die Angabe in Sv aber die biologische Wirksamkeit berücksichtigt, ist sie ein von der Strahlenqualität unabhängiges Schädigungsmaß.

Als Endpunkt für die Bestimmung von Strahlenwichtungsfaktoren wird klassischerweise das *klonogene Überleben* (die Fähigkeit zur Koloniebildung durch Teilung einer einzelnen Zelle) nach Bestrahlung von Zellen mit unterschiedlichen Energiedosen in vitro gemessen. Je nach Fragestellung sind auch andere Endpunkte möglich; im Allgemeinen hängt das Resultat vom Endpunkt, der Reparaturkapazität der Zellen und dem betrachteten Ausmaß der Schädigung (z.B. 50% oder 10% klonogenes Überleben) ab. Unterschiedliche Strahlenwichtungsfaktoren sind deshalb nur bedingt miteinander vergleichbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der RBW ein weiteres Vergleichsmaß für die strahlenspezifische biologische Wirksamkeit verwendet: die *relative dosisäquivalente Wirksamkeit* (RDW) gibt an, wie hoch die biologische Wirkung einer Strahlung im Vergleich zur Wirkung einer Referenzstrahlung bei gleicher Energiedosis ist.

$$RDW = \frac{W_u}{W_{ref}} \quad \begin{array}{ll} RDW & \text{Relative dosisäquivalente Wirksamkeit} \\ W_u & \text{Wirkung der untersuchten Strahlung} \\ W_{ref} & \text{Wirkung der Referenzstrahlung} \end{array} \quad (1.2)$$

Die unterschiedliche biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlungsarten ist eine Konsequenz aus ihrer charakteristischen Art des Energieübertrags auf Materie. Die *Ionisationsdichte* der Strahlung scheint hierbei maßgeblich zu sein. Der *lineare Energietransfer* (LET) ist ein indirektes Maß für die Ionisationsdichte, das häufig im Zusammenhang mit Partikelstrahlung verwendet wird. Der LET gibt an, wie viel Energie ein ionisierendes Teilchen pro Längeneinheit an das durchdrungene Material abgibt und wird üblicherweise in $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ausgedrückt. Für ein bestimmtes Teilchen verhält sich die Ionisationsdichte proportional zum LET. Unterschiedliche Teilchen mit gleichem LET haben jedoch unterschiedliche Ionisationsdichten, da ihr Wirkungsquerschnitt von der Teilchenenergie abhängt [4]. Entsprechend unterscheidet sich beispielsweise die RBW von Protonen- und ^{12}C -Ionen-Strahlung mit gleichem LET. Ungeachtet dessen ordnen viele Autoren in der strahlentherapeutischen Literatur Photonen und Protonen in spärlich ionisierende *Niedrig-LET-Strahlung* und Schwerionen und Neutronen in dicht ionisierende *Hoch-LET-Strahlung* ein.

Entscheidend für das Ionisationsverhalten und die biologische Wirkung von Strahlung ist welche Wechselwirkungen in welchem Umfang ablaufen können. Im Folgenden werden die für die Strahlentherapie relevanten Wechselwirkungen von Photonen- und Schwerionenstrahlung mit Materie beschrieben. Die Informationen stammen großteils aus [5].

1.1.2. Wechselwirkungen ionisierender Photonenstrahlung

Die Photonen der Röntgen- und γ -Strahlung können abhängig von ihrer Energie, teilweise oder vollständig, von Materie absorbiert oder gestreut werden. Sie können dabei mit der Atomhülle, dem elektrischen Feld der Atomkerne oder den Kernteilchen selbst wechselwirken. Die Wechselwirkungen mit der Atomhülle umfassen die *klassischen Streuung*, die *Fotoionisation* und die *Compton-Streuung*.

Bei der klassischen Streuung erfährt das Photon eine Richtungsänderung ohne Energieverlust (siehe Abb. 1.2). Hierdurch wird keine Energie an die durchstrahlte Materie (den *Absorber*) übertragen, die Strahlung wird jedoch dispergiert, so dass sich ein gerichteter *Strahl* (ein Strahlenbündel, das sich in eine bestimmte Richtung ausbreitet) aufweitet und dadurch an Leistungsdichte (*Intensität*) verliert. Klassische Streuung tritt nur bei Photonenenergien unterhalb von etwa 20 keV auf. In der Strahlentherapie betrifft dies nur weiche Röntgenstrahlung, die heute kaum mehr eine Rolle spielt.

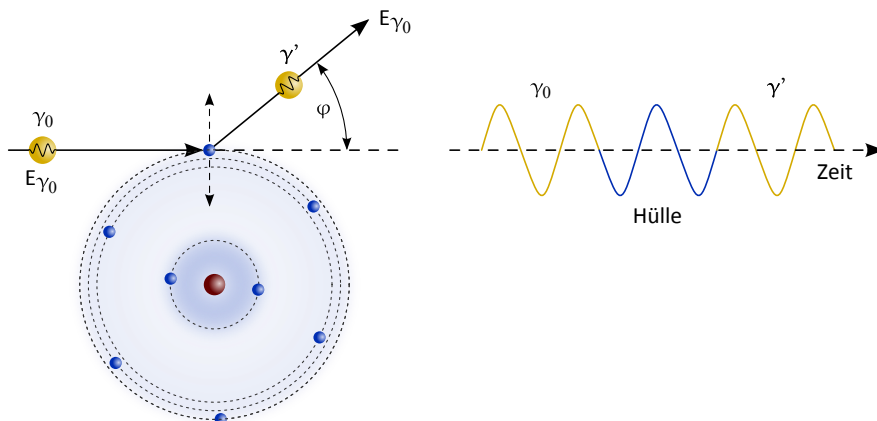


Abbildung 1.2. | Klassischen Streuung. Links: Das Photon γ_0 wird in der Elektronenhülle absorbiert, die Elektronen schwingen kurze Zeit gemeinsam und senden die Anregungsenergie dann wieder vollständig in Form eines Photons γ' mit neuer Ausbreitungsrichtung aus. Rechts: Das einfallende Photon, die Elektronenhülle und das gestreute Photon schwingen ohne Phasenverschiebung mit derselben Frequenz. Quelle: modifiziert nach [5].

Bei der Fotoionisation (auch *äußerer Photoeffekt* oder einfach *Photoeffekt* genannt) wird das Photon von einem Elektron aus einer inneren Elektronenschale absorbiert, das dadurch aus dem Atom hinausgeschleudert wird (siehe Abb. 1.3). Die Photonenenergie muss dafür die Bindungsenergie des Elektrons übersteigen. Das freigesetzte δ -Elektron kann in der Folge zusätzliche Wechselwirkungen auslösen, *Bremsstrahlung* abgeben (d.h. Photonen emittieren wenn es gebremst oder beschleunigt wird) und weitere Atome ionisieren. Die Lücke, die das Elektron in seinem Mutteratom hinterlässt kann zur Emission weiterer Elektronen führen, so dass das Atom mehrfach ionisiert wird (*Auger-Effekt*).

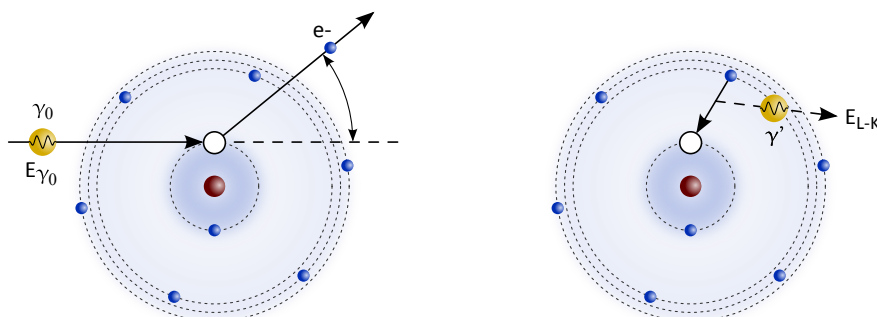


Abbildung 1.3. | Fotoionisation. Links: Das Photon γ_0 wird von einem Elektron in der K-Schale absorbiert, das hierdurch dem Atom entkommt und eine Potentiallücke hinterlässt. Rechts: Die Lücke wird durch ein Elektron aus der L-Schale aufgefüllt. Die Energie aus der Potentialdifferenz wird in Form eines Photons γ' emittiert oder setzt Auger-Elektronen frei. Quelle: modifiziert nach [5].

Bei der Compton-Streuung schlägt ein Photon ein schwach gebundenes (*quasi freies*) Elektron aus der äußeren Schale der Atomhülle und wird dabei nur teilweise absorbiert. In welchem Winkel Photon und Elektron gestreut werden, und wie viel Energie und Impuls auf das Elektron übertragen wird, hängt von der Energie des einfallenden Photons ab: Gegenüber der Einfallrichtung kann das Elektron seitlich und nach vorne gestreut werden, das Photon kann außerdem zurückgestreut werden (Streuwinkel $>90^\circ$). Mit zunehmender Photonenenergie werden für beide Stoßpartner kleine Streuwinkel nahe der Vorwärtsrichtung immer wahrscheinlicher.

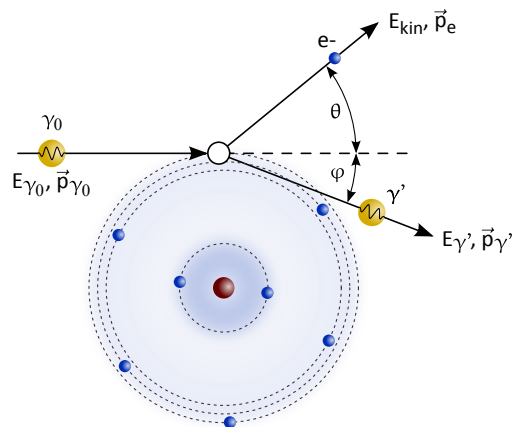


Abbildung 1.4. | Comptonstreuung. Das Photon γ_0 überträgt einen Teil seiner Energie und seines Impulses auf ein quasi freies Hüllenelektron, das hierdurch aus dem Atom geschlagen wird. Das Photon wird abgelenkt und fliegt mit verminderter Frequenz, beziehungsweise vergrößerter Wellenlänge weiter. Der Vorgang entspricht einem elastischen Stoß, bei dem sich Energie und Impuls des einfallenden Photons γ_0 vollständig auf das Elektron und das gestreute Photon γ' verteilen (unter Vernachlässigung eines geringen Rückstoßimpulses auf das Atom). Quelle: modifiziert nach [5].

Oberhalb der Ruheenergie des Elektrons (511 keV) ist der Energieübertrag effizienter und stärker vom Streuwinkel abhängig als darunter. Da die Elektronen mehr Energie erhalten, erhöht sich ihre Reichweite (sie können weitere Strecken ohne Wechselwirkungen zurücklegen). Dies führt zu dem für medizinisch genutzte Photonenstrahlung typischen *Dosisaufbaueffekt*. Die Energie, die der Absorber aufnimmt, steigt dabei hinter der Eintrittsfläche der Strahlung zunächst an, bevor sie aufgrund der abnehmenden Strahlintensität wieder sinkt. In menschlichem Gewebe kann die Elektronenreichweite bei den in der Strahlentherapie üblichen Photonenenergien mehrere Zentimeter betragen.

Im elektrischen Feld des Atomkerns tritt ab Photonenenergien von 1022 keV *Paarbildung* auf (siehe Abb. 1.5). Dabei *zerstrahlt* das Photon in ein *Elektron-Positron-Paar* (das Photon wird „vernichtet“). Auf ihrem Weg durch einen Absorber geben die entstandenen Teilchen ihre Bewegungsenergie durch Zusammenstöße mit Atomen in vielen kleinen Portionen ab.

Die Paarbildung kann auch im elektrischen Feld eines Elektrons stattfinden. In diesem Fall nimmt das Elektron den Differenzimpuls zwischen Photon und dem erzeugten Teilchen-Antiteilchen-Paar auf. Wegen seiner geringen Masse wird das Elektron dabei stark beschleunigt und verlässt das Atom. Da diese Form der Paarbildung drei strahlende Teilchen erzeugt, wird sie auch *Triplettbildung* genannt. Aus Gründen der Energie- und Impulserhaltung erfordert die Triplettbildung mindestens die doppelte Photonenenergie wie die Paarbildung im Kernfeld.

Bei noch höheren Energien können Photonen *Kernreaktionen* auslösen (siehe Abb. 1.6).

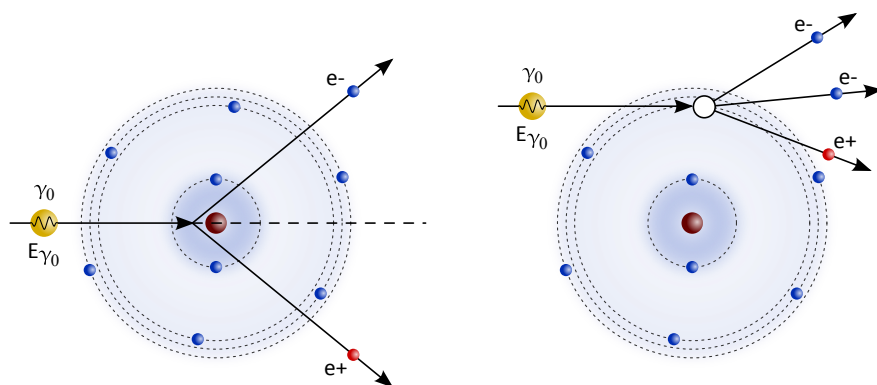


Abbildung 1.5. | Paarbildung. Links: Das Photon γ_0 zerstrahlt im Coulombfeld eines Atomkerns in ein Elektron und ein Positron. Das Atom erfährt dadurch einen Rückstoßimpuls, der angesichts der Kernmasse aber nicht zu nennenswerten Bewegungen führt. Rechts: Bei der Triplettbildung zerstrahlt das Photon im Coulombfeld eines Elektrons. Das Elektron nimmt den Rückstoßimpuls auf und wird aufgrund seiner geringen Masse so stark beschleunigt, dass es zusammen mit dem Teilchen-Antiteilchen-Paar das Atom verlässt. Quelle: modifiziert nach [5].

Die Photonen werden dabei vollständig vom Kern absorbiert und erhöhen die thermische Bewegung der Kernteilchen (*Protonen* und *Neutronen*), oder regen diese zu kollektiven Schwingungen an. Übersteigt die Anregungsenergie die *Separationsenergie* des am schwächsten gebundenen Kernteilchens, so verlässt dieses den Kern und trägt die überschüssige Energie als Bewegungsenergie mit sich (*Kernfotoeffekt*). Es können auch zwei Kernteilchen auf einmal emittiert werden.

Die übrigen Kerne sind häufig instabil und daher *radioaktiv*. In radiologisch genutzten Bestrahlungsräumen kann es deshalb zur *Aktivierung* von Materialien im Strahlengang kommen, zum Beispiel in der Luft oder den Wänden. Schwere Kerne, wie bei Uran, können durch Photonen geeigneter Energie gespalten werden (*Photospaltung*). Reicht die Anregungsenergie nicht aus um ein Kernteilchen abzustößen, so strahlt sie der Kern wieder in Form von Photonen ab (*Kern-Fluoreszenz*).

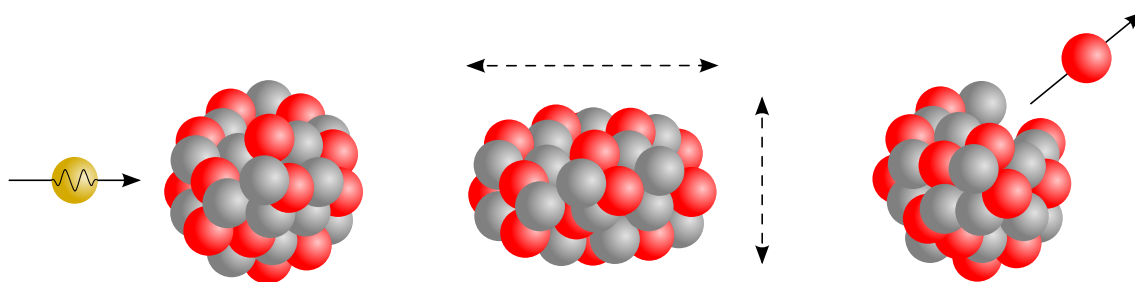


Abbildung 1.6. | Kernfotoeffekt. Links: Ein mittelschwerer Atomkern absorbiert ein Photon. Mitte: Die Kernteilchen werden zu thermischen oder kollektiven Schwingungen angeregt. Rechts: Übersteigt die Anregungsenergie die Separationsenergie eines Kernteilchens, so entkommt es dem Kern und trägt die überschüssige Energie als Bewegungsenergie mit sich. Die restlichen Kerne sind häufig instabil und zerfallen weiter. Quelle: modifiziert nach [5].

In der medizinischen Radiologie und im Strahlenschutz stellen Fotoionisation, Comptoneffekt und Paarbildung die relevanten Wirkmechanismen für Photonenstrahlung dar. Die Fotoionisation dominiert bei niedrigen Photonenenergien und Materialien mit hohen Ordnungszahlen wie Blei, das bei Abschirmungen für den Strahlenschutz zum Einsatz kommt.

In menschlichem Gewebe, das aus vergleichsweise leichten Elementen besteht, spielt die Photoionisation nur im Rahmen der Röntgendiagnostik eine Rolle. Für die Strahlentherapie mit Photonen ist der Comptoneffekt zwischen 30 keV und 30 MeV von zentraler Bedeutung. Den größten Beitrag zur biologischen Wirkung liefern dabei die sekundären Comptonelektronen. Die Paarbildung ist als Wirkmechanismus für die Strahlentherapie von untergeordneter Bedeutung, stellt jedoch oberhalb von 10 MeV den wichtigsten Prozess für die Wechselwirkungen mit schweren Absorbern dar.

Photonenstrahlung gilt als *indirekt ionisierend*, da nicht die Photonen selbst, sondern die von ihnen erzeugte *Sekundärstrahlung* für den Hauptteil der Ionisierungen verantwortlich ist. Mit steigender Photonenenergie treten die Welleneigenschaften der elektromagnetischen Strahlung immer weiter in den Hintergrund und die Teilcheneigenschaften bestimmen zunehmend den Charakter der Strahlung.

1.1.3. Wechselwirkungen von Schwerionenstrahlung

Im Gegensatz zu Photonenstrahlung wirkt Strahlung aus geladenen Teilchen *direkt ionisierend*. Die Teilchen geben ihre Energie portionsweise durch elektromagnetische und starke Wechselwirkung mit Atomen und Atomkernen ab. Dabei treten Ionisierungen und Kernreaktionen auf, bei denen Sekundärteilchen frei werden. Bei ausreichend hoher Energie können diese weitere Atome ionisieren und in einer Kaskade einen Teilchenschauer auslösen.

Hochenergetische Schwerionen werden aufgrund ihrer hohen kinetischen Energie kaum durch Atomhüllen beeinflusst; sie müssen erst durch Zusammenstöße mit Atomkernen verlangsamt werden, um effizient mit Elektronen zu wechselwirken. Aus diesem Grund werden Schwerionen beim Durchgang durch Materie kaum gestreut und geben den Großteil ihrer Energie am Ende ihrer Flugbahn ab. Die Energiedeposition verhält sich proportional zum Kehrwert der Ionenenergie. Entsprechend weist die Dosisverteilung entlang der Flugbahn eines Schwerions einen lang gezogenen flachen Abschnitt auf, gefolgt von einer scharf begrenzten Spitze, hinter der keine weitere Dosis anfällt, bis auf eine geringe Restdosis durch aktivierte Ionenfragmente. Die Dosis Spitze wird *Bragg-Peak* genannt, nach William Bragg, der sie 1904 zum ersten Mal für α -Strahlen beschrieb. Protonenstrahlung zeigt ebenfalls einen Bragg-Peak, der jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt ist wie bei Schwerionen (siehe Abb. 1.7 in Abschnitt 1.2.1).

1.2. Strahlentherapie

Die *Strahlentherapie* beruht auf der Zerstörung von Molekülen durch das Aufbrechen chemischer Verbindungen mit Hilfe von ionisierender Strahlung (Photonenstrahlung von 10 keV bis 50 MeV und noch energiereichere Protonen- und Schwerionenstrahlung). Ziel ist es, Tumorzellen zumindest so weit zu schädigen, dass sie ihre Teilungsfähigkeit verlieren und gleichzeitig gesundes Gewebe zu schonen. Maßgeblich ist dabei die Beschädigung der DNA. Schäden an Proteinen, Lipiden und anderen austauschbaren Zellbestandteilen sind irrelevant, es sei denn, sie lösen unmittelbar chemische Reaktionen aus, die zur Beschädigung der DNA beitragen, oder sie verletzen die Zellintegrität so sehr, dass die Zelle ausläuft (*Nekrose*).

1.2.1. Klinische Relevanz der Teilchentherapie

Photonen-basierte Strahlentherapie hat den Nachteil, dass die Strahlung den Körper vollständig durchdringt und somit unweigerlich auch gesundes Gewebe erreicht. Partikelstrahlung dringt hingegen nur bis zu einer gewissen Tiefe in den Körper ein, die sich über die kinetische Energie der Teilchen einstellen lässt. Deshalb gab es bereits in den 1940er Jahren Bestrebungen, Teilchenstrahlung für die Strahlentherapie zu nutzen. Erste klinische Studien mit schnellen Neutronen zeigten zwar gute Tumorkontrollraten, verursachten aber zu schwere Nebenwirkungen [6]. Spätere Studien mit Protonen und He-Ionen waren vielversprechend, und seitdem wächst das Interesse an der Nutzung von Schwerionen, wobei sich ^{12}C -Ionen als besonders vorteilhaft erwiesen haben.

Bei der konventionellen Photonentherapie fällt die höchste Dosis aufgrund des Dosisaufbaueffekts (siehe Abschnitt 1.1.2) wenige Zentimeter unter der Haut an und nimmt dann mit zunehmender Eindringtiefe exponentiell ab. Tief liegende Tumoren müssen daher aus verschiedenen Winkeln bestrahlt werden, um die Dosis im Zielvolumen aufzusummieren und die Schädigung von umliegendem gesundem Gewebe auf ein akzeptables Maß zu beschränken. Protonen, He- und Schwerionen weisen hingegen einen Bragg-Peak auf, der eine erheblich genauere Dosiskonformation erlaubt (siehe Abb. 1.7). Durch Modulation der Teilchenenergie lässt sich die Lage des Bragg-Peaks verändern, um das Tumervolumen Punkt für Punkt in 3D abzurastern. Dabei werden mehrere verschobene Bragg-Peaks derart überlagert, dass sich in der Summe ein möglichst glatter *spread-out Bragg-Peak (SOBP)* mit homogener Dosis im Zielvolumen ergibt.

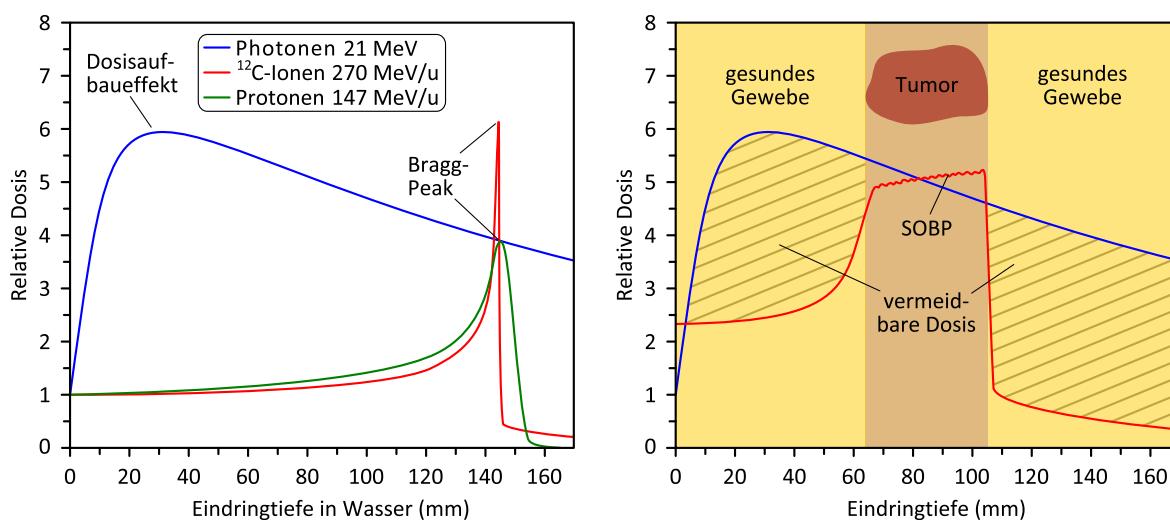


Abbildung 1.7. | Dosisprofile im Vergleich. Rechts: Photonenstrahlung zeigt beim Eindringen in einen Absorber einen Dosisaufbaueffekt, während Protonen und ^{12}C -Ionen einen Bragg-Peak aufweisen. Quelle: modifiziert nach [4]. Links: Durch Modulation der Teilchenenergie können mehrere Bragg-Peaks zu einem spread-out Bragg-Peak (SOBP) überlagert werden, mit dem sich ein Tumervolumen unter Schonung von umliegendem Gewebe genauer erfassen lässt als durch Photonenstrahlung.

Im Vergleich zu Protonen ist bei Schwerionen der Bragg-Peak ausgeprägter und das Streuverhalten günstiger. Neben den physikalischen Vorteilen bei der Dosiskonformation besitzt Schwerionenstrahlung außerdem eine erhöhte biologische Wirksamkeit. Bei ^{12}C -Ionen steigt

die RBW auf den letzten Zentimetern der Ionenflugbahn an, und fällt in den Bereich des Bragg-Peaks und des größten LETs. Dies ist besonders günstig, da es die Effizienz der höheren Energiedosis im Bragg-Peak nochmals erhöht. Bei schwereren Ionen tritt die maximale RBW aufgrund von Sättigungseffekten bereits vor dem Bragg-Peak ein, bei Protonen erst im Niedrig-Dosis-Bereich dahinter, auf den letzten Mikrometern ihrer Reichweite [4]. Für klinisch genutzte Protonenstrahlung zwischen 160 und 230 MeV werden RBW-Werte von 1,1 bis 1,2 gegenüber Photonenstrahlung angenommen, während bei der ^{12}C -Ionen-Therapie mit Werten zwischen 2 und 5 im Zielvolumen gerechnet wird.

Darüber hinaus scheint die Wirkung von ^{12}C -Ionen-Strahlung weniger stark von der Zellzyklusphase und der Sauerstoffversorgung der Krebszellen abzuhängen, als bei der klassischen Photonentherapie [7]. Vor allem bei langsam wachsenden und schlecht durchbluteten Tumoren, die sich relativ resistent gegenüber der konventionellen Behandlung zeigen, ist dies von großem Wert.

In Deutschland wurde bereits in den 1960er Jahren über den Nutzen von Schwerionenstrahlung für die Strahlentherapie nachgedacht. Die Machbarkeit einer solchen *Schwerionentherapie* erforschte federführend die 1969 gegründete „Gesellschaft für Schwerionenforschung“, die heute unter dem Namen „GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung“ (GSI) bekannt ist [8]. In ihrem Sitz in Darmstadt wurde 1997 der erste Patient mit ^{12}C -Ionen bestrahlt. An dem Pilotprojekt, in dem bis 2008 über 400 Patienten mit verschiedenen Indikationen behandelt wurden, waren neben der GSI auch das DKFZ, die Klinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie des Universitätsklinikums Heidelberg und das Helmholtzzentrum Dresden-Rossendorf (HZDR) beteiligt [9,10].

Darauf aufbauend wurde das „Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum“ (HIT) des Universitätsklinikums Heidelberg konzipiert [11]. Die Grundsteinlegung erfolgte im Jahr 2005 und seit November 2009 läuft der Patientenbetrieb [12]. Das HIT ist eine bislang einzigartige klinische Einrichtung. Weltweit sind derzeit nur drei weitere Ionenstrahl-Therapiezentren in Betrieb: zwei in Japan und seit Ende 2012 eine in Italien. Das HIT ermöglicht sowohl Schwerionen-, als auch Protonentherapien, und verfügt als Alleinstellungsmerkmal über eine um 360° rotierbare Strahlführung (*Gantry*), die es erlaubt, den Patienten aus allen Raumrichtungen zu bestrahlen. Eine weitere Besonderheit ist die enge Verknüpfung der Strahlentherapie mit der medizinischen Forschung, in deren Rahmen auch die vorliegende Arbeit eingebettet ist.

1.2.2. Die Phasen der biologischen Wirkung ionisierender Strahlung

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, die sich über Zeiträume von Sekundenbruchteilen bis hin zu Generationen erstrecken (siehe Abb. 1.8). In der *physikalischen Phase* findet die Energieabsorption in der Zelle statt, wodurch in der *radiochemischen Phase* Moleküle ionisiert werden und chemische Verbindungen aufbrechen. Kommt es nicht unmittelbar zur Nekrose, so ist die Entstehung von DNA-Schäden während der *biochemischen Phase* wesentlich für die Entfaltung der biologischen Wirkung. Der Erfolg von DNA-Reparaturmechanismen entscheidet über das Schicksal der Zelle und die Folgen für den Gesamtorganismus in der *biologischen Phase*.

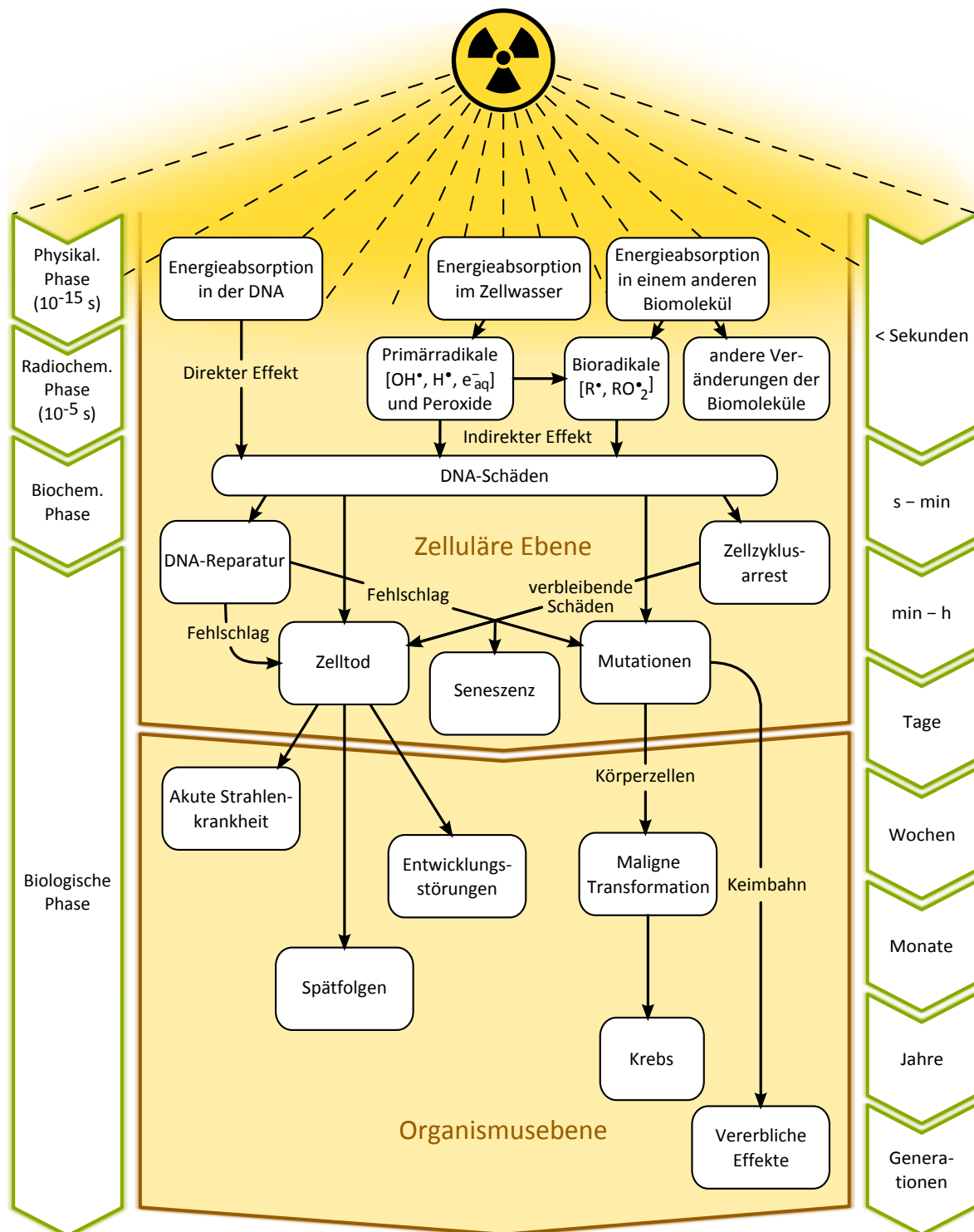


Abbildung 1.8. | Biologische Folgen ionisierender Strahlung. Sofern die Zelle nicht durch Nekrose stirbt, ist die Entstehung von DNA-Schäden wesentlich für die Entfaltung der biologischen Wirkungen ionisierender Strahlung. Die Schäden entstehen direkt oder indirekt in der DNA und ziehen Zelltod, Seneszenz oder Mutationen nach sich, falls ihre Reparatur misslingt. Für den Gesamtorganismus können sich Folgen ergeben, die sich mitunter erst nach langen Zeiträumen zeigen.

1.3. DNA-Schäden

Es gibt eine Vielzahl verschiedener DNA-Schäden und spezialisierter Reparatursysteme um sie zu beheben (siehe Abschnitt 1.5). Man schätzt, dass unter physiologischen Bedingungen täglich etwa 100 000 DNA-Schäden in jeder Zelle eines Menschen auftreten [13]. Abschätzungen darüber, welche Schadensarten wie häufig vorkommen, sind in [14] zusammengefasst. Zum Großteil haben DNA-Schäden *endogene* Ursachen, wie Oxidationen durch Sauerstoffradikale, die im Zuge des Stoffwechsels entstehen, Replikationsfehler oder spontane chemische Modifikationen der Basen. Häufig katalysiert das Zellwasser schadhafte Reaktionen: Die hydrolytische Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin oder von Cytosin zu Uracil bewirkt beispielsweise Basenfehlpaarungen. Auch die hydrolytische Abspaltung ganzer Basen vom Desoxyribose-Residuum ist möglich (*Depurinierung*, beziehungsweise *Depyrimidinierung*).

Die wichtigsten *exogenen* Ursachen von DNA-Schäden stellen UV-Licht, ionisierende Strahlung und mutagene Substanzen in der Umwelt und unserer Nahrung dar (Abgase, Zigarettenrauch, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine, aber auch erbgutverändernde Viren und Toxine von Bakterien und Pilzen). Zudem gefährdet erhöhte Temperatur die chemische Stabilität der DNA². Die Einwirkung von UV-Licht führt vor allem zu *Pyrimidin-Dimeren* (*Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere* oder *6-4-Photoprodukte*) durch Quervernetzung zweier benachbarter Guanin- oder Thymin-Basen auf demselben DNA-Strang [15]. Auch indirekte Schäden durch Erzeugung von Sauerstoffradikalen sind möglich [16].

Ionisierende Strahlung besitzt ein besonders hohes Schädigungspotenzial, da sie in der Lage ist, chemische Bindungen zu spalten. Auch hierbei können DNA-Schäden direkt induziert werden, oder indirekt durch Ionisierung anderer Moleküle, die daraufhin mit der DNA reagieren [17,18]. Dementsprechend groß ist die Vielfalt möglicher Schäden, zu denen Basenmodifikationen, Vernetzungen innerhalb der DNA oder mit Proteinen, sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche zählen [19].

Treten mehrere Schäden in unmittelbarer räumlicher Nähe auf, so werden sie als *geclusterte Schäden* bezeichnet [20,21]. Je größer die Anzahl der Schäden in einem Cluster ist, desto höher ist die Komplexität des Clusters. Die Anhäufung vieler Schäden in kurzer Abfolge erschwert die Reparatur, vor allem wenn es sich um viele unterschiedliche oder besonders schwerwiegende Schäden handelt. Es wird angenommen, dass Schwerionenstrahlung besonders komplexe Schäden verursacht, da die Ionen ihre Energie stoßweise und nur entlang ihrer Flugbahn abgeben [22] (abgesehen von Sekundärstrahlung, die abseits der Flugbahn weitere Schäden verursachen kann). Demnach gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Komplexitätsgrad der Schäden und dem LET der Strahlung, der sich in der biologischen Wirksamkeit niederschlägt [23,24].

1.3.1. DNA-Doppelstrangbrüche

Doppelstrangbrüche (DSBs) stellen eine besonders große Gefahr für die Zelle dar, da sie unmittelbar die Integrität des Genoms verletzen, und weil eine sequenzgenaue Reparatur nur in bestimmten Situationen möglich ist (siehe Abschnitt 1.5.1). DSBs sind ausschlaggebend für die zellabtötende Wirkung ionisierender Strahlung und der zentrale Forschungsgegenstand dieser Arbeit.

²deshalb wird die *Therapeutische Hyperthermie* zur Unterstützung der Strahlentherapie angewandt.

Ein DSB ist eine bündige oder um einige Nukleotide versetzte Unterbrechung beider Stränge eines DNA-Moleküls. Zu unterscheiden sind *zweiendige DSBs*, bei denen tatsächlich ein Bruch innerhalb des Moleküls vorliegt, und *einendige DSBs*, die ein offenes Ende des Chromatinfadens darstellen. Letztere entstehen in der S-Phase, wenn die Replikationsgabel auf einen Einzelstrangbruch oder eine Einzelstranglücke trifft [25]. Die Enden der linearen Chromosomen von Eukaryoten gelten in diesem Zusammenhang nicht als einendige DSBs, da sie unter physiologischen Bedingungen nicht offen liegen; im Menschen bilden sie dank der Telomere und einer Reihe telomerbindender Proteine eine *T-Schleife* aus, die sie vor Nuklease-Abbau, der Erkennung durch DSB-Reparatursysteme³ und Chromosomenfusionen schützt.

Beide DSB-Arten können durch ionisierende Strahlung verursacht werden: zweiendige DSBs als Primärschäden, die unmittelbar durch die Strahlung induziert werden (in allen Zellzyklusphasen), und einendige DSBs als Sekundärschäden, die verzögert während der DNA-Replikation aus Einzelstrangunterbrechungen hervorgehen (auch diese müssen nicht zwangsläufig direkte Folgen der Strahlung sein, sondern können beispielsweise bei der Reparatur beschädigter Nukleotide durch BER [27] oder NER entstehen).

Einendige und zweiendige DSBs unterscheiden sich nicht nur durch ihre Entstehung voneinander, sie lösen auch verschiedene Signalkaskaden aus (siehe Abschnitt 1.4.1) und können auf verschiedene Weise repariert werden (siehe Abschnitt 1.5.1)

1.4. Die DNA-Schadensantwort

Die Integrität des Genoms ist nicht nur für das Überleben einzelner Zellen von höchster Bedeutung, sondern auch für den Gesamtorganismus, da die Entartung selbst weniger Zellen aufgrund von Mutationen durch DNA-Schäden zu Krebs führen kann. Im Laufe der Evolution haben sich daher nicht nur vielfältige DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, sondern auch Mechanismen, die irreparabel geschädigte Zellen gezielt eliminieren (*programmierter Zelltod*) oder unschädlich machen, indem sie weitere Zellteilungen unterbinden (*Seneszenz*). Die Abstimmung dieser Prozesse wird durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen gewährleistet, das in seiner Gesamtheit als *DNA-Schadensantwort* bezeichnet wird (für eine sehr ausführliche Darstellung sei auf [14] verwiesen).

Es reicht von der Schadenserkenkung, über temporäre Zellzyklusunterbrechungen, während denen Reparaturversuche unternommen werden, bis hin zu den biologischen Spätfolgen für die Zelle, falls die Reparatur scheitert. Die zeitliche Abstimmung dieser Signalwege ist entscheidend für das Schicksal der Zelle: Reparaturprozesse greifen sehr schnell, weil sie durch posttranslationale Modifizierungen kritischer Reparaturproteine ausgelöst werden, die ständig in der Zelle vorgehalten werden; Spätfolgen setzen verzögert ein, weil sie großteils auf transkriptionaler Ebene eingeleitet werden. Hierdurch können DNA-Schadenssignale über längere Zeit integriert werden, so dass die Zelle in der Lage ist, den Reparaturerefolg zu beurteilen und Spätfolgen gegebenenfalls noch abzuwenden.

³dennoch sind Kernkomponenten der DSB-Erkennung (ATM, der MRN-Komplex und die Ku-Proteine, siehe Abschnitt 1.4.1 und 1.5.1) am Aufbau und der Aufrechterhaltung der Telomerstruktur beteiligt. Während einer kurzen Zeitspanne, in der die T-Schleife nach der Replikation noch nicht wiederhergestellt ist, können diese Signalproteine Einfluss auf die Telomer-Homöostase nehmen, indem sie wie bei normalen DSBs Zellzyklusblockaden auslösen und der Telomerase erlauben erodierte Telomere wiederherzustellen [26].

1.4.1. Schadenserkennung und Signalverstärkung

DSBs und lange Einzelstrangabschnitte, die vor allem durch blockierte Replikationsgabeln entstehen, sind gut etablierte Auslöser der DNA-Schadensantwort. Andere DNA-Schäden können auch repariert werden, ohne eine vollständige Schadensantwort mit Zellzyklusblockaden oder weitergehende Konsequenzen auszulösen, es sei denn sie behindern akut die Replikation. Dies unterstreicht die besonders große Gefahr für die Genomintegrität, die von DSBs und Replikationsfehlern ausgeht.

Die Erkennungssignale für Einzelstranglücken und DSBs überlappen in weiten Teilen, sind aber nicht identisch. Ihre zentralen Komponenten sind die *Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen* ATM, ATR und DNA-PK, sowie die *Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen* PARP-1 und PARP-2 und der MRN-Komplex. DNA-PK, PARP-1/2 und der MRN-Komplex sind unmittelbar an der Schadenserkennung und den Reparaturprozessen beteiligt, während ATM und ATR eher regulatorische Funktionen ausüben und zu den wichtigsten Vermittlern der weiteren Schadensantwort zählen (siehe Abb. 1.9).

DSBs werden entweder durch DNA-PK oder PARP erkannt. PARP-1 und PARP-2 werden nicht nur durch Bindung an DSBs, sondern auch an Einzelstrangbrüche und -überhänge aktiviert, für deren Reparatur sie ebenfalls von Bedeutung sind (siehe Abschnitt 1.5.2). Die Enzyme markieren die Bruchenden, indem sie Poly-(ADP-Ribose)-Ketten an Chromatinproteine (unter anderem H1 und H2B Histone) anheften. Dies erleichtert die Rekrutierung des MRN-Komplexes [28]. Der MRN-Komplex besteht aus 2 Molekülen *Mre11* und jeweils einem Molekül *Rad50* und *Nibrin* (*NBS-1*). *Mre11* besitzt Endo- und Exonuklease-Aktivität, die für die DSB-Reparatur relevant sind (siehe Abschnitte 1.5.1 und 1.5.1), und eine DNA-Bindfunktion, mit deren Hilfe die Bruchenden eng zusammengehalten werden [29]. *Rad50* ist ein Gerüstprotein, das ebenfalls über eine DNA-Bindfunktion verfügt und außerdem einen langen Seitenarm besitzt, über den sich zwei MRN-Komplexe verhaken können [30]. Vermutlich können hierdurch auch weiter entfernte DSB-Enden beieinandergehalten werden. *NBS-1* vermittelt die Rekrutierung von ATM an die Schadstelle. Dies führt zu einer MRN-abhängigen Autophosphorylierung inaktiver ATM-Dimere, die hierdurch zu aktiven Monomeren dissoziieren [31,32]. Im weiteren Verlauf der DSB-Reparatur kann es zusätzlich zur Aktivierung von ATR kommen [33] (siehe Abschnitt 1.5.1).

ATR ist der entscheidende Signalgeber bei blockierten Replikationsgabeln. Wenn die Replikation ins Stocken gerät, entkoppelt sich die DNA-Helikase *MCM* von der DNA-Polymerase und entwindet weiterhin den Doppelstrang [35]. Es entstehen lange Einzelstrangabschnitte, die zur Stabilisierung von *RPA* gebunden werden. Die Nukleoprotein-Filamente, die sich hierdurch ausbilden, rekrutieren ATR über direkte Wechselwirkung mit seinem Bindepartner, dem *ATR-interagierenden Protein* (*ATRIP*) [36]. Außerdem fördern sie die Rekrutierung des *9-1-1 Komplexes*, einem Ringklammerprotein aus *Rad9*, *Hus1* und *Rad1*, das über *TopBP1* mit ATR interagiert und dessen Kinaseaktivität hierdurch erheblich verstärkt [37]. Länger anhaltende Replikationsblockaden führen häufig zu sekundären DSBs unter aktiver Beteiligung von Nukleasen mit anschließender ATM-Aktivierung. In einigen Situationen geschieht dies offenbar durch DNA-PK und die Nuklease *Artemis* [25], die sonst bei der Reparatur von DSBs zusammenwirken (siehe Abschnitt 1.5.1). Glückt die Reparatur, so kann die Replikation wiederaufgenommen werden. ATR kann auch eine DNA-Schadensantwort auslösen, wenn längere Einzelstrangabschnitte unabhängig von der Replikation entstehen, z.B. im Zuge der *Nukleotidexzisionsreparatur* [38], die eine besondere Bedeutung für die Reparatur von

UV-Schäden spielt (siehe Abschnitt 1.5.3).

ATM, ATR und DNA-PK phosphorylieren eine Vielzahl verschiedener Proteine, die für die Schadensantwort wichtig sind und beeinflussen sich gegenseitig durch direkte und indirekte Interaktionen. Alle 3 Kinasen phosphorylieren das Histon *H2AX* an Ser139 in unmittelbarer Nähe des Schadens [39–41]. Diese phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und hat große Bedeutung für die Verstärkung von Schadenssignalen, sowie die Bindung von Reparaturproteinen [42] und Chromatin-modifizierenden Faktoren an den Schadensort (siehe Abb. 1.9). Die Chromatin-modifizierenden Proteine unterstützen die Reparatur, indem sie das Chromatin lokal auflockern und damit zugänglicher machen.

H2AX ist eine Histonvariante aus der Familie der *H2A* Histone, von denen je 2 Vertreter in jedem Nukleosom enthalten sind [43]. Von allen Varianten besitzt nur H2AX die schadensspezifische Phosphorylierungsstelle. Sie ist Teil eines SQ-Motivs am C-Terminus, das als Erkennungsstelle für die Kinasen und weitere Interaktionspartner dient. Die H2AX-Phosphorylierung breitet sich ausgehend vom Schadensort aus und lässt sich durch Fluoreszenzmarkierung mit spezifischen Antikörpern gut sichtbar machen. Wird die Schadensantwort von DSBs durch Photonenstrahlung ausgelöst, so zeigen sich dabei scharf abgegrenzte Punkte, die als γ H2AX Foci bezeichnet werden und sich bereits wenige Sekunden nach Bestrahlung formieren [44]. Die Foci bilden sich durch eine Kettenreaktion zwischen ATM,

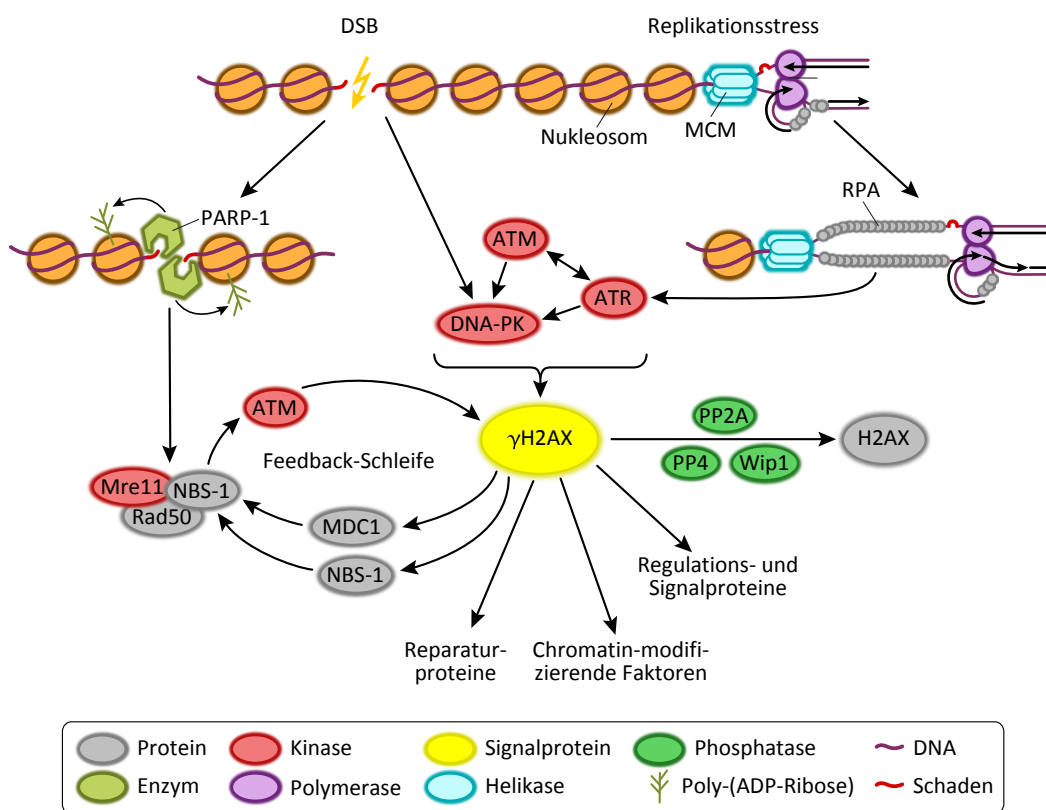


Abbildung 1.9. | Schadenserkenkung und Signalverstärkung. Die DNA-Schadensantwort wird von DSBs oder langen Einzelstranglücken ausgelöst. Einzelstranglücken können durch Replikationsstress entstehen und führen zur Aktivierung von ATR. DSBs werden durch DNA-PK erkannt, oder von PARP-1/2 markiert, um den MRN-Komplex zu rekrutieren. ATM, ATR und DNA-PK phosphorylieren H2AX zu γ H2AX, das über eine Kettenreaktion mit NBS-1, MDC1 und ATM/ATR die Schadenssignale amplifiziert und außerdem viele weitere Proteine an den Schadensort bindet. Quelle: modifiziert nach [34].

γ H2AX und dem *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1): Nach der initialen H2AX-Phosphorylierung durch ATM oder DNA-PK bindet MDC1 an γ H2AX, ATM bindet an MDC1 und phosphoryliert das nächste H2AX-Molekül [45]. Für diese Interaktionen sind zwei Bindemotive von MDC1 entscheidend: Die *BRCA1 C-Terminus (BRCT)* Domäne erkennt das phosphorylierte SQ-Motiv von γ H2AX und die *forkhead-associated (FHA)* Domäne vermittelt die ATM-Bindung. NBS-1 aus dem MRN-Komplex verfügt ebenfalls über beide Domänen und kann über beide an MDC1 binden [46]. Dies erleichtert möglicherweise die Rekrutierung der ersten MDC1-Moleküle unmittelbar an den Bruchenden.

Im Gegensatz zu den diskreten γ H2AX Foci führt UV-Bestrahlung zu einer gleichmäßigen diffusen γ H2AX-Färbung im gesamten Zellkern (*pan-nukleäres γ H2AX*), die nicht durch DSBs hervorgerufen wird. Sie kommt in allen Zellzyklusphasen vor, ist aber in der S-Phase besonders stark [47] und wird durch ATR vermittelt [48], das hierzu mit NBS-1 und MDC1 interagiert [38]. ATR bindet dabei nicht wie ATM an den C-Terminus von NBS-1, sondern an den N-Terminus, der die BRCT und FHA Domänen enthält. Replikationsbedingt können nach UV-Bestrahlung sekundäre DSBs entstehen, die zusätzlich zu dem pan-nukleären γ H2AX ATM-abhängige Foci hervorrufen [49] (mitunter sind diese schwer erkennbar).

1.4.2. Weiterleitung von Schadenssignalen

Neben Reparaturversuchen leiten ATM und ATR Zellzyklusblockaden ein, indem sie die Kontrollpunkt-Kinasen *Chk1* und *Chk2* durch Phosphorylierung aktivieren [50,51] (siehe Abb. 1.10). *Chk1* und *Chk2* phosphorylieren daraufhin die Phosphatasen *Cdc25A* und *Cdc25C*. Dies hemmt die Phosphatasen, führt zum Abbau von *Cdc25A* durch das Proteasom [52] und bewirkt den Kernexport von *Cdc25C* [53]. Die Phosphatasen haben die Aufgabe die *Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs)* zu dephosphorylieren, die zusammen mit ihren Coenzymen, den *Cyclinen* die Zellzyklusprogression regulieren. Ohne diese Dephosphorylierung bleiben die CDKs inaktiv, was im Fall von *CDK4/6–Cyclin D* und *CDK2–Cyclin E* zu einem G1-Arrest und im Fall von *CDK2–Cyclin B* zu einem G2-Arrest führt. Auch die S-Phase kann in mehreren Stadien unterbrochen werden.

Bei Replikationsstress aktiviert ATR *Chk1*, das daraufhin MCM von *Cdc45* entkoppelt und so die Reifung der DNA-Präreplikationskomplexe zu Initiationskomplexen verhindert [54]. *Chk1/2*, ATM, ATR und DNA-PK phosphorylieren außerdem den Transkriptionsfaktor *p53*, der die G1/S-Hemmung unterstützt, indem er die Expression des CDK-Inhibitors *p21* fördert [55,56]. Für die Fortsetzung des Zellzyklus nach erfolgreicher Reparatur ist die Dephosphorylierung von γ H2AX durch die Proteinphosphatasen *PP2A* [57], *PP4* [58] und *Wip1* [59] erforderlich. Neben vorübergehenden Zellzyklusblockaden kann *p21* dauerhafte Seneszenz vermitteln.

Viele weitere Proteine stehen unter der transkriptionalen Kontrolle von *p53*; es ist eines der wichtigsten Regulationselemente an der Schnittstelle zwischen DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und dem programmierten Zelltod (siehe Abb. 1.11). Die Phosphorylierung von *p53* führt zu dessen Stabilisierung und Anhäufung im Zellkern. Die *p53*-abhängige E3 Ubiquitin-Ligase *Mdm2* wirkt dem entgegen, indem sie in einer negativen Rückkopplungsschleife *p53* ubiquitiniert und zum Abbau durch das Proteasom freigibt. *Wip1* und ATM sind ebenfalls an diesem Regelkreis beteiligt: ATM hemmt *Mdm2* durch Phosphorylierung an Ser395, während *Wip1* dem entgegenwirkt und die Bindung von *Mdm2* an *p53* fördert [61]. Durch die periodische Aktivierung von *p53* wird erreicht, dass sich Schadenssignale erst allmählich in der

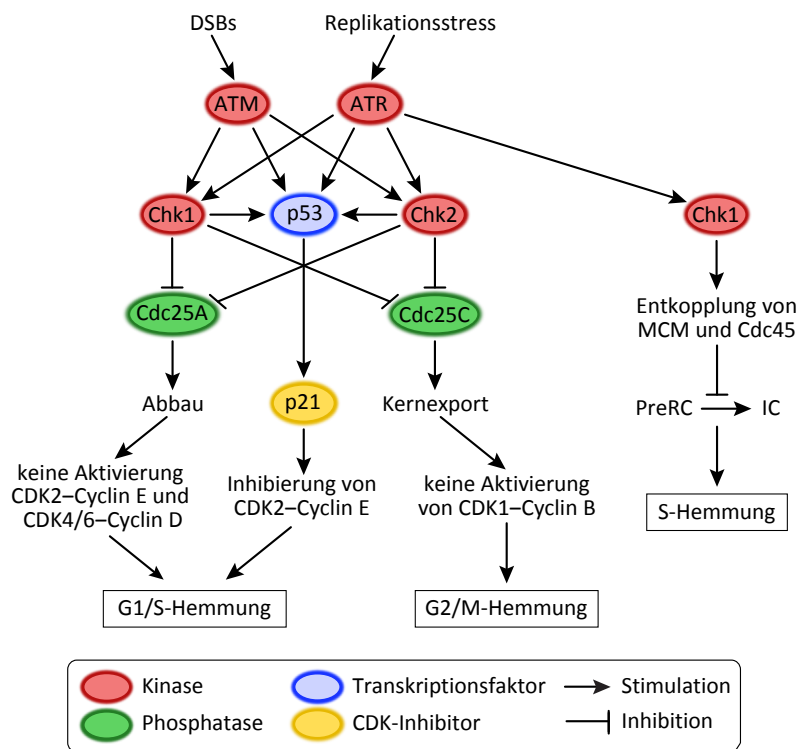


Abbildung 1.10. | Einleitung von Zellzyklusblockaden. ATM und ATR vermitteln Zellzyklusblockaden durch Aktivierung der Kontrollpunktkinasen Chk1 und Chk2, sowie p53. Dies führt zur Deaktivierung der Phosphatasen Cdc25A und Cdc25C, die zur Aktivierung der CDKs erforderlich sind. Quelle: modifiziert nach [60].

Zelle anreichern und Spätfolgen erst eingeleitet werden, wenn die DNA-Reparatur zu lange dauert [62]. Aufgrund der großen Bedeutung von p53 für die Vermeidung von unkontrollierten Zellteilungen ist das zugehörige Gen *TP53* eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene. Es ist in 60% aller menschlichen Tumorerkrankungen verändert und häufig der Grund dafür, dass Krebszellen trotz massiver DNA-Schäden nicht absterben. Bei der hier untersuchten Glioblastom-Zelllinie U87 MG liegt keine TP53-Mutation vor.

1.4.3. γ H2AX als DSB-Marker

Die Entdeckung der DSB-spezifischen γ H2AX Foci hat die radiobiologische Forschung beflügelt und zu vielen neuen Erkenntnissen über DNA-Reparaturmechanismen und die räumliche und zeitliche Regulation der Schadensantwort geführt. Das Auszählen der immunchemisch markierten Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop ist die sensitivste Methode zum DSB-Nachweis, die bislang zur Verfügung steht. Ihre Anzahl korreliert mit der Menge der DSBs und steigt zwischen wenigen mGy und einigen Gy Photonenstrahlung linear mit der Dosis [63]. Die anfängliche Annahme dass 1 γ H2AX Fokus genau einem DSB entspricht [44,64], ist jedoch aus heutiger Sicht nicht mehr uneingeschränkt haltbar [34]. Besonders für DSB-Schäden durch dicht ionisierende Partikelstrahlung ist diese Hypothese zweifelhaft und das Zählen der Foci kann schwierig sein, da sich kurz nach Bestrahlung oft linienartige Gebilde entlang der Partikelflugbahn an Stelle von diskreten Foci zeigen. Die Erfassung solcher qualitativer Eigenheiten ist unverzichtbar für das Verständnis der strahlenspezifischen Wirkung verschiedener Strahlungsarten. In dieser Arbeit wurde ein automatisiertes Mikroskopiesys-

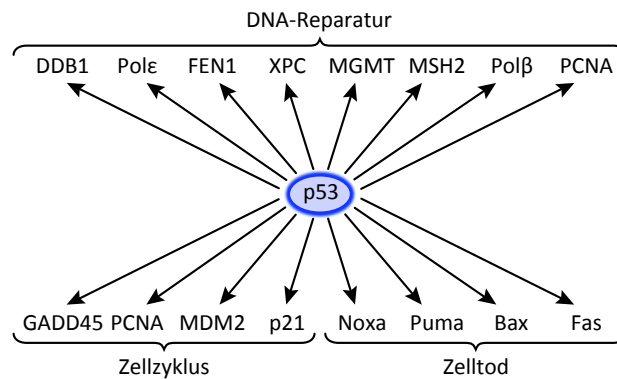


Abbildung 1.11. | **Transkriptionales Netzwerk von p53.** Auswahl einiger wichtiger Proteine über die der Transkriptionsfaktor p53 die DNA-Reparatur, die Zellzyklusprogression und den programmierten Zelltod reguliert. Quelle: modifiziert nach [60].

tem eingesetzt, um nicht nur die Anzahl von γ H2AX Foci nach Bestrahlung zu bestimmen, sondern auch die Focigröße, sowie die Intensität der Färbung innerhalb und außerhalb (pannukleär) der Foci objektiv und quantitativ zu erfassen. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit dem Hersteller des Systems (MetaSystems) die zuvor verfügbare Standardmessung wesentlich erweitert.

Für höhere Dosen ist die Intensität der Immunfärbung ein geeigneteres Maß zur Beurteilung des DSB-Schadens. Sie kann in hohem Durchsatz durchflusszytometrisch gemessen werden. Für verschiedene Zelllinien (menschliche Krebs- und Normalgewebszellen, sowie Hamsterzellen) wurde gezeigt, dass die γ H2AX-Intensität nach Bestrahlung mit 250 kV Photonen bis weit über 20 Gy linear mit der Dosis steigt [65]. Die meisten Zelllinien zeigten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Sättigung der γ H2AX-Intensität zwischen 50 und 100 Gy. Die Durchflusszytometrie (FACS) erlaubt außerdem eine multivariate Analyse weiterer Parameter, die für die Strahlenantwort relevant sind [66]. In dieser Arbeit wurde eine FACS-Methode etabliert, die eine Zellzyklusphasen-spezifische γ H2AX-Messung erlaubt und zusätzlich die Quantifizierung von Apoptose ermöglicht.

Die Betrachtung der γ H2AX-Intensität oder Focianzahl im Zeitverlauf ist eine wichtige Methode zur Beurteilung der DSB-Reparaturkapazität im Vergleich verschiedener Zelllinien oder Strahlungsarten [67,68]. Bleiben die Werte gegenüber unbestrahlten Kontrollen auch nach mindestens 24 h noch erhöht, so wird angenommen, dass dies auf irreparable Restschäden hinweist [69]. Neben seinem Nutzen für die Grundlagenforschung hat sich der Nachweis von γ H2AX in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug in vielen Gebieten der angewandten Wissenschaft und Medizin entwickelt [70,71]. Beispiele sind sein Einsatz in klinischen Studien für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente [72], sowie in der Biodosimetrie zur prospektiven und retrospektiven Risikoabschätzung von Strahlungsunfällen [73].

1.5. DNA-Reparatur

Die wichtigsten Reparaturmechanismen werden nachfolgend besprochen. Allen Reparaturmechanismen gemein ist ein hoher Grad an Flexibilität: einige Proteine haben Funktionen bei mehreren Reparaturmechanismen, doch umgekehrt existieren für die meisten Aufgaben mehrere redundante Proteine. Scheitert ein bestimmter Reparaturweg, so kann die Re-

ratur in manchen Fällen durch einen anderen Mechanismus abgeschlossen werden. Dies gewährleistet eine effiziente und gleichzeitig robuste DNA-Reparatur. Die beschriebenen Reparaturmechanismen sind daher nicht als unveränderlich zu sehen, sondern als Modell für einen typischen Ablauf.

1.5.1. DSB-Reparatur

Säugerzellen verwenden hauptsächlich zwei DSB-Reparaturwege: die *nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung* (NHEJ, engl. *non-homologous end joining*), und die Reparatur durch *homologe Rekombination* (HRR, engl. *homologous recombination repair*). Bei der NHEJ werden die Bruchenden von fehlerhaften Nukleotiden befreit und direkt miteinander verbunden. NHEJ führt deshalb grundsätzlich zum Verlust einiger Nukleotide.⁴ Die Reparatur erfolgt schnell, ist in allen Zellzyklusphasen möglich und kommt hauptsächlich zum Einsatz um einfache DSBs in Euchromatin zu reparieren. Da die Reparatur das Vorhandensein von zwei Bruchenden in räumlicher Nähe bedingt, können einendige DSBs nicht durch NHEJ repariert werden. Neben künstlich erzeugten DSBs repariert NHEJ auch die gezielt physiologisch ausgelösten DSBs im Rahmen der *V(D)J Rekombination* bei B- und T-Zellen und dem *Klassenwechsel* bei B-Zellen, wodurch die große Vielfalt der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren erreicht wird [76].

Die HRR nutzt einen homologen Sequenzabschnitt als Matrize, um einen größeren Bereich um die Bruchstelle durch intakte DNA zu ersetzen. Der Mechanismus entspricht zum Großteil der homologen Rekombination, die während der Meiose abläuft und dem Austausch von väterlicher und mütterlicher Erbinformation (*vertikaler Gentransfer*) dient. Im Gegensatz dazu findet der Sequenzaustausch im Rahmen der DSB-Reparatur normalerweise zwischen dem beschädigten Doppelstrang und seinem Schwesterchromatid statt; der vertikale Gentransfer wird unterdrückt. Die Reparatur erfolgt daher im Prinzip fehlerfrei, ist aber in der Regel auf die späte S- und G2-Phase beschränkt. HRR dauert deutlich länger als NHEJ und wird mit der Reparatur komplexer DSBs und DSBs im Heterochromatin in Verbindung gebracht. Außerdem spielt die HRR eine besondere Rolle bei der Reparatur einendiger DSBs.

Nicht-homologe End-zu-End Verbindung

Die Proteine Ku70 und Ku80 bilden ringförmige Heterodimere, die an den Bruchenden die DNA umklammern und die *katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase* (DNA-PKcs, engl. *DNA-PK catalytic subunit*) rekrutieren, so dass der aktive DNA-PK Komplex entsteht [77] (siehe Abb. 1.12). DNA-PK hält die Bruchenden eng zusammen und vermittelt die Bindung und Aktivierung weiterer NHEJ Komponenten [78]. Autophosphorylierung führt zur Dissoziation der DNA-PKcs und leitet die weitere Prozessierung der Bruchenden vor der abschließenden Ligation ein [79]. Eine Bearbeitung der Bruchenden ist nur dann erforderlich, wenn diese nicht kompatibel sind oder beschädigte Nukleotide aufweisen [80]. Die aus der Einzelstrangbruch-Reparatur bekannte PNK kann beispielsweise chemisch modifizierte 5'-Phosphat und 3'-OH Gruppen der Desoxyribose wiederherstellen; die Nuklease Artemis

⁴nach Entfernung fehlerhafter Nukleotide können auch neue eingefügt werden, so dass in der Summe Nukleotide hinzukommen [74,75]. Fehlerhafte Nukleotide sind dennoch verloren; nur im Fall bündiger DSBs ohne Beschädigung der Nukleotide (z.B. durch eine Nuklease) kann die NHEJ zur fehlerfreien Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz führen (äußerst unwahrscheinlich bei strahleninduzierten DSBs).

kann Nukleotide entfernen und mit Hilfe der Polymerasen μ und λ können Einzelstranglücken aufgefüllt, sowie zusätzliche Nukleotide an den 3'-Enden hinzugefügt werden [75]. Der Ligationskomplex, der schließlich die Bruchenden miteinander verknüpft, enthält *DNA-Ligase IV (Lig IV)*, *XRCC4* und dessen Coenzym *XLF/Cernunnos*. XRCC4–XLF-Multimere bilden hierbei Filamente aus, die sich parallel verlaufend um den DNA-Doppelstrang wickeln und die Bruchenden überbrücken [81]. Die Filamente können an die Ku-Proteine binden und sind möglicherweise schon während der Einleitung der NHEJ von Bedeutung um die Bruchenden in räumlicher Nähe zu halten.

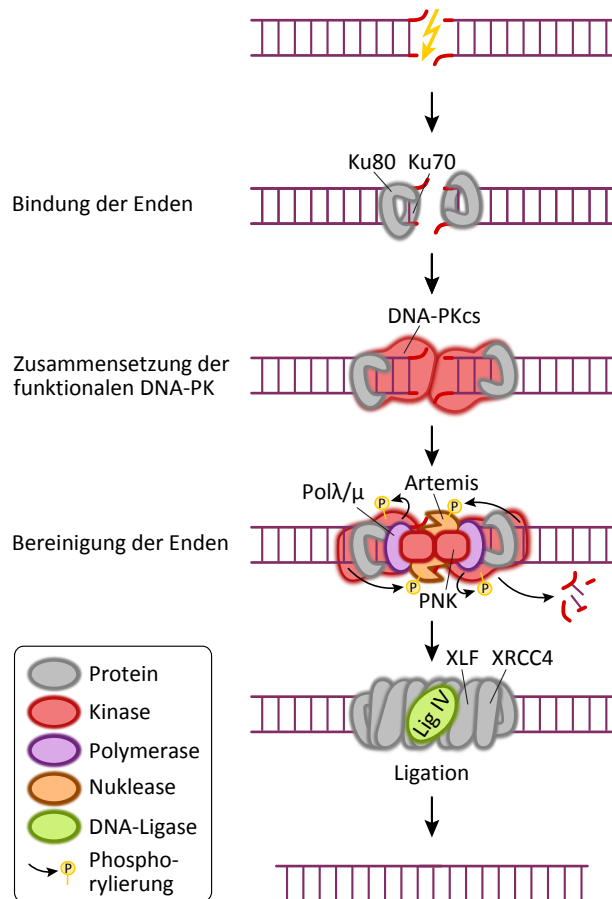


Abbildung 1.12. | Nicht-homologe End-zu-End Verbindung. Der DNA-PK-abhängige Mechanismus zur DSB-Reparatur (D-NHEJ) verläuft in der Regel nicht fehlerfrei, da die Bruchenden nicht ohne vorherige Bereinigung beschädigter Nukleotide wiederverbunden werden können. Quelle: modifiziert nach [82].

In Ku/DNA-PK-defizienten Zellen wurde ein alternativer NHEJ-Mechanismus beschrieben, der über PARP, *Histon H1* und *DNA-Ligase III (Lig III)* vermittelt wird und als *Backup-NHEJ (B-NHEJ)* bezeichnet wird [83,84]. B-NHEJ basiert wahrscheinlich auf Mikrohomologien zwischen den Bruchenden, weshalb manche Autoren auch von *microhomology-mediated end-joining (MMEJ)* sprechen. Darüber hinaus könnten weitere NHEJ-Varianten existieren, die ohne Mikrohomologie auskommen, beziehungsweise mit Hilfe von Polymerasen erst welche einführen [85]. Die alternativen Reparaturwege werden durch den DNA-PK-abhängigen Mechanismus (D-NHEJ) unterdrückt und spielen normalerweise keine große Rolle; sie zeigen jedoch, wie wandlungsfähig und redundant die DSB-Reparaturmaschinerie ist.

Homologe Rekombination

Der Ablauf der Homologen Rekombination lässt sich in drei aufeinanderfolgende Phasen einteilen: die *Präsynapse*, die *Synapse* und die *Postsynapse* (siehe Abb. 1.13). Die Präsynapse beginnt mit einer ausgedehnten *Resektion* der Bruchenden, wodurch lange 3'-Überhänge entstehen. Zunächst entfernen die Nukleasen Mre11 (aus dem MRN Komplex) und CtIP eine begrenzte Anzahl von Nukleotiden an den 5'-Enden. Hierdurch wird die weitergehende Resektion durch *Exonuklease 1 (Exo1)* und *BLM-Dna2* lizenziert [86]. *RPA* Proteine binden an die freigelegten Einzelstrangabschnitte und stabilisieren sie. Die resultierenden Nukleoprotein-Filamente rekrutieren das *ATR-interagierende Protein (ATRIP)*, wodurch *ATR* aktiviert werden kann, so dass eine DNA-Schadenssignalkaskade ausgelöst wird, die zum Zellzyklusarrest führt [36].

Während der Synapse sorgen *BRCA1*, *BRCA2* und *Rad52* für den Austausch von *RPA* mit *Rad51* [88,89]. Dabei handelt es sich um eine DNA-abhängige ATPase, die sowohl doppel-

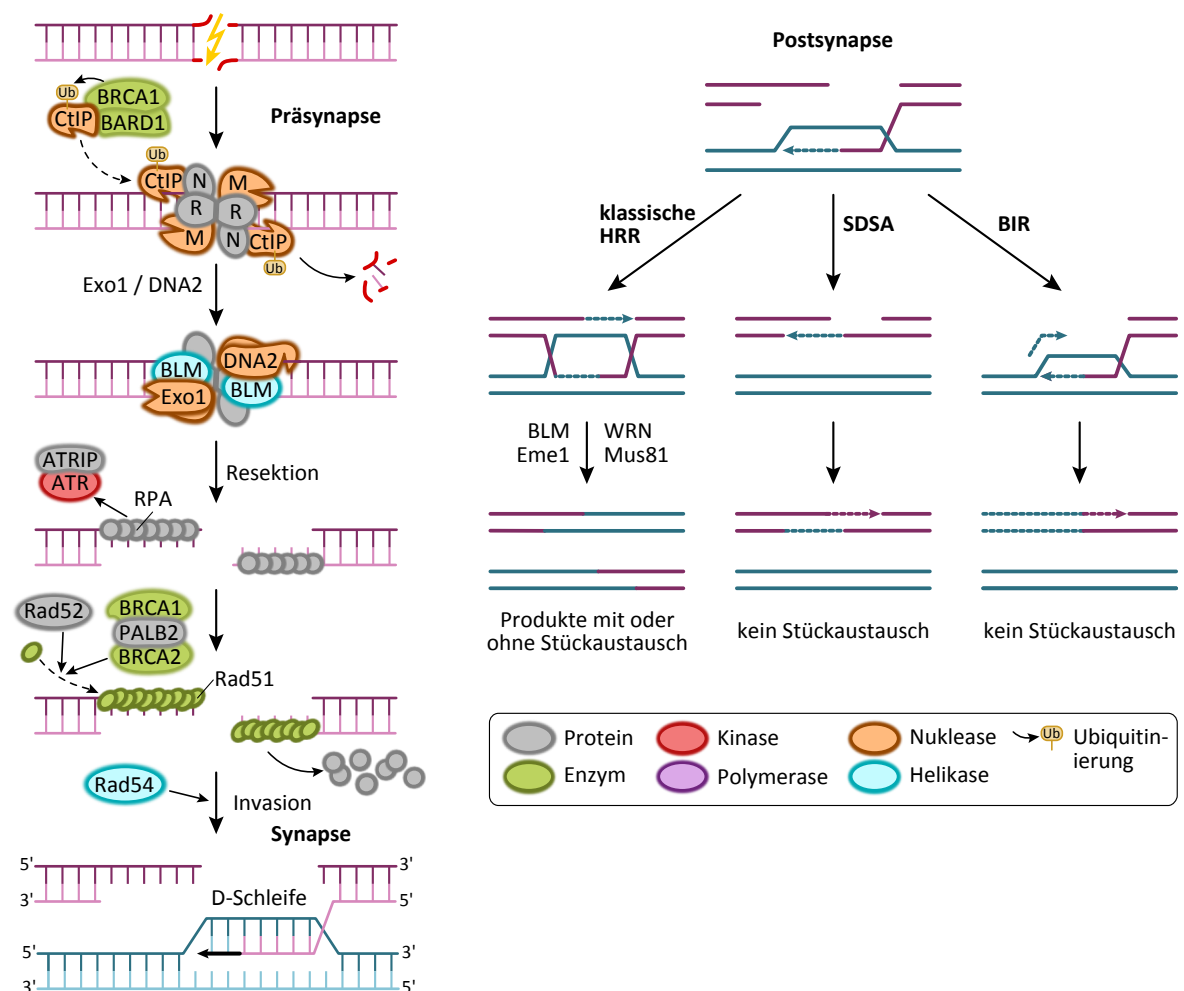


Abbildung 1.13. | Homologe Rekombination. Die Resektion der Bruchenden ermöglicht die Invasion eines Einzelstrangs in den homologen Abschnitt des Schwesterchromatids. Es entsteht eine *D-Schleife*, die eine homologiebasierte Neusynthese des verlorenen Sequenzabschnitts erlaubt. Der klassische Reparaturweg führt zu Produkten mit oder ohne Stückaustausch zwischen den homologen Chromatiden. Bei der Synthese-abhängigen Stranghybridisierung (*SDSA*) und der Bruch-induzierten Replikation (*BIR*) kommt kein Stückaustausch vor. Quelle: modifiziert nach [82] und [87].

strängige, als auch einzelsträngige DNA binden kann. Zusammen mit Rad52 und der Helikase *Rad54* vermittelt Rad51 die Homologiesuche und *Invasion* des Einzelstrangs eines Bruchendes in die Doppelhelix der Matrize [90]. Dadurch paart sich der Bruchstrang mit dem komplementären Strang der Matrize, während der homologe Matrizenstrang verdrängt wird. Die resultierende Struktur ist eine *D-Schleife* (engl. *displacement loop*, kurz *D-loop*); sie ermöglicht Leitstrang-DNA-Synthese durch eine Polymerase, wobei das 3'-Ende des beschädigten Chromatids als Primer dient.

In der Postsynapse sind einige alternative Mechanismen möglich, die für den Ausgang der Reparatur von Bedeutung sind. Im Fall von zweiendigen DSBs kann der Einzelstrang des zweiten Bruchendes mit dem verdrängten Strang der Matrize gepaart werden (durch direkte Hybridisierung oder Invasion). Dabei entsteht eine doppelte *Holliday-Struktur* (zweifache Überkreuzung beider Doppelstränge), die an beiden Bruchenden die Neusynthese fehlender Abschnitte ermöglicht. Anschließend können die Holliday-Strukturen auf unterschiedliche Weise aufgelöst werden, die mit oder ohne Stückaustausch⁵ zwischen den beiden Chromatiden einhergehen. An der Auflösung der Holliday-Strukturen sind die Helikasen BLM und WRN, sowie die Nukleasen MUS81-EME1, SLX1-SLX4 und GEN1 beteiligt [91]. Die Ligation verbleibender Einzelstrangbrüche schließt die Reparatur ab. Dieser Reparaturweg stellt die *klassische HRR* dar.

Ausgehend von der D-Schleife kann alternativ *Synthese-abhängige Stranghybridisierung* (engl. *synthesis-dependent strand annealing*, kurz *SDSA*) ablaufen. Dabei löst sich der invasive Bruchstrang wieder von der Matrize, sobald die Neusynthese genügend Überhang erzeugt hat, dass er mit dem komplementären Strang des zweiten Bruchendes hybridisieren kann [92]. Verbleibende Einzelstranglücken können dann geschlossen werden, ohne dass es zur Ausbildung von Holliday-Strukturen kommt; ein Stückaustausch findet daher nicht statt.

Bei der *Bruch-induzierten Replikation (BIR)* wird die D-Schleife in ein vollständige Replikationsgabel umgewandelt, die den gesamten Sequenzabschnitt der Matrize ab der Bruchstelle bis zum Ende des Chromatids kopiert [87]. Der Prozess beinhaltet sowohl Leitstrang- als auch Folgestrang-Synthese. Die Matrize bleibt unverändert (es findet kein Stückaustausch statt). BIR ist der Hauptmechanismus zur Reparatur einendiger DSBs, sowie zur Auflösung blockierter oder kollabierter Replikationsgabeln.

Wahl des DSB-Reparaturwegs

In Situationen, die eine DSB-Reparatur sowohl durch NHEJ, als auch HRR erlauben (bei zweiendigen DSBs in der späten S-Phase und der G2-Phase), hängt die Wahl des Reparaturwegs von der Komplexität der Schadstelle, sowie vom Chromatinkontext ab: Einfache DSBs im Euchromatin werden vorwiegend schnell (innerhalb von ~2 h) durch NHEJ repariert, während komplexe DSBs und DSBs im Heterochromatin hauptsächlich über mehrere Stunden hinweg durch HRR repariert werden [93,94]. Die Reparaturgeschwindigkeit scheint eine wichtige Einflussgröße bei der Wahl des Reparaturwegs zu sein, und es gibt die Hypothese, dass NHEJ in jedem Fall den ersten Reparaturversuch darstellt. Verläuft die End-Verknüpfung jedoch nicht effizient, so kann sie demnach zu Gunsten von HRR abgebrochen werden [84,95].

⁵im Fall von Schwesterchromatiden spricht man von *Schwesterchromatidaustausch*. Häufig wird allgemein der Begriff *Crossing-over* benutzt, obwohl er definitionsgemäß ausschließlich den Austausch zwischen Nicht-Schwesterchromatiden der homologen Chromosomen bei der Meiose bezeichnet.

Aus regulatorischer Sicht bestimmt das Ausmaß der Bruchenden-Resektion, welcher Reparaturweg eingeschlagen wird [86]. DNA-PK und *53BP1-Rif1* hemmen die Rekrutierung von Exo1, wodurch die End-Resektion limitiert und NHEJ gefördert wird, während *CtIP-BRCA1* die Exo1-Rekrutierung fördert und HRR begünstigt [96–98]. Zusätzlich kann der MRN-Komplex als pro-HRR-Faktor auftreten, indem er über die Mre11-vermittelte Nuklease-Aktivität die End-Resektion anstößt und den Komplex aus Lig IV, XRCC4 und XLF/Cernunnos hemmt [29]. Die Ku-Proteine wirken dem entgegen, indem sie mit PARP-1/2 um die Bindung der Bruchstelle konkurrieren. Sie hemmen dadurch die PARP-vermittelte Markierung der Bruchenden durch Poly-(ADP-Ribose)-Ketten, von der die Rekrutierung des MRN-Komplexes abhängt.

Eine wichtige Rolle in diesem regulatorischen Netzwerk kommt außerdem der ATM Kinase zu. Erstens fördert sie die HRR im Heterochromatin indirekt, indem sie das Chromatin-Umbau-Protein *KAP-1* phosphoryliert [99]. Dies bewirkt eine lokale Auflockerung des Chromatins, die der HRR Maschinerie den Zugang erlaubt. Zweitens trägt die ATM Kinase direkt zur HRR bei, indem sie CtIP [95] und BRCA1 [100] phosphoryliert. Andererseits phosphoryliert ATM auch 53BP1, wodurch Rif1 rekrutiert wird und zusammen mit 53BP1 BRCA1-CtIP inhibiert. ATM kann also auch NHEJ fördern und diese Funktion scheint in der G1-Phase vorzuherrschen, während ab der S-Phase die Unterstützung der HRR überwiegt [96,98].

1.5.2. Basenexzisionsreparatur

Kleinere Basenschäden durch Desaminierung, Alkylierung, Hydrolyse oder Oxidation werden durch *Basenexzisionsreparatur (BER)* behoben (siehe Abb. 1.14). Verschiedene *DNA-Glykosylasen* prüfen die Basen auf spezifische Schäden, indem sie am DNA-Rückgrat entlangwandern und die Basen einzeln aus der Doppelhelix herausdrehen (engl. *base flipping*) [101]. Ist eine Base beschädigt, so entfernt sie die DNA-Glykosylase durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung mit dem Desoxyribose-Residuum des DNA-Rückgrats.

Zurück bleibt eine *AP-Stelle* (nach engl. *apurinic*, beziehungsweise *apyrimidinic site*), wie sie auch durch spontane Depurinierung oder Depyrimidinierung entsteht. *AP-Endonukleasen* (im Menschen hauptsächlich *APE-1*) trennen an solchen Basenfehlstellen die Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats auf.⁶ Es entsteht ein Einzelstrangbruch mit 3'-OH-Gruppe und 5'-Desoxyribose-Phosphat-Rest. Durch ionisierende Strahlung verursachte Einzelstrangbrüche weisen häufig andere Restgruppen auf. Diese müssen zunächst durch die *Polynukleotidkinase (PNK)* bereinigt werden, bevor sie ebenfalls durch die nachfolgenden Schritte repariert werden können.

Es gibt zwei alternative Wege zum Abschluss der Reparatur [103]. Der vorherrschende Mechanismus wird als *short patch BER* bezeichnet: *DNA-Polymerase β (Pol β)* ersetzt das fehlende Nukleotid basierend auf dem intakten Komplementärstrang und Lig III versiegelt den verbleibenden Einzelstrangbruch. Beide Enzyme komplexieren dabei mit *XRCC1*. Im Gegensatz dazu werden bei der *long patch BER* mehrere Nukleotide ersetzt, wobei neben Pol β auch die Polymerasen δ und ϵ im Komplex mit dem Ringklammerprotein *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* zum Einsatz kommen. Durch die Neusynthese werden bereits vorhandene Nukleotide verdrängt. Die Überhänge werden durch *flap endonuclease 1 (FEN1)* abgeschnitten und die Ligation übernimmt *DNA-Ligase I (Lig I)*.

⁶Einige DNA-Glykosylasen besitzen Endonuklease-Aktivität und können Nukleotide auch ohne die Hilfe von AP-Endonukleasen entfernen.

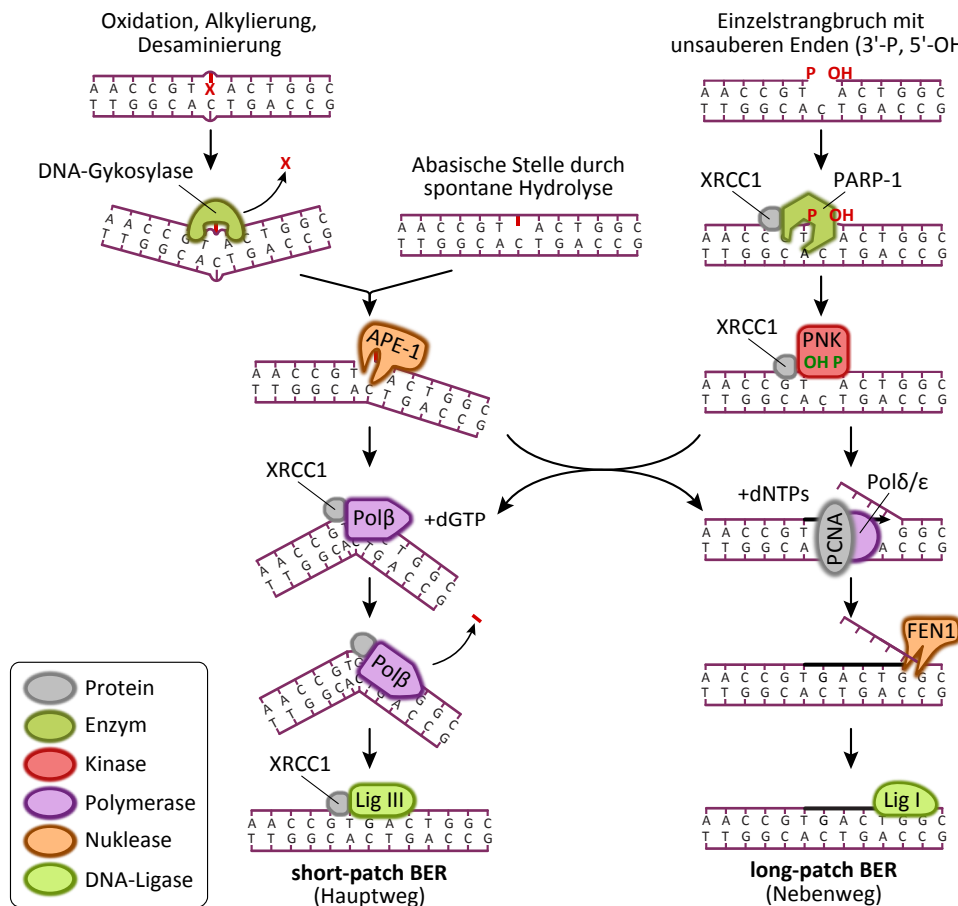


Abbildung 1.14. | Basenexzisionsreparatur. Beschädigte Basen werden durch Basenexzisionsreparatur (BER) korrigiert, wobei entweder nur das beschädigte Nucleotid ersetzt wird (short-patch BER), oder zusätzlich einige weitere (long-patch BER). Quelle: modifiziert nach [102].

PARP-1 spielt für die Koordinierung der BER und der Schadensantwort der Zelle (auch bei anderen Reparatursystemen) eine Rolle. Es rekrutiert verschiedene BER-Komponenten und hängt ihnen und sich selbst in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion Poly-(ADP-Ribose)-Ketten an, die offenbar für die zeitliche Abfolge der BER von Bedeutung sind und als Energiequelle für den Ligationsschritt dienen [104]. PARP interagiert unter anderem mit APE-1, PNK, XRCC1 und Pol β .

1.5.3. Nucleotidexzisionsreparatur

Modifizierungen, die zu stärkeren Störungen der DNA-Struktur führen, wie z.B. Pyrimidin-Dimere, werden durch *Nucleotidexzisionsreparatur* (NER) korrigiert. Die NER hat deshalb eine besonders große Bedeutung für die Vermeidung von UV-induzierten Mutationen [105]. Einige vererbliche Defekte der NER-Kernkomponenten führen zu schwerwiegenden Krankheitsbildern, die mit erhöhter Lichtempfindlichkeit und vorzeitiger Alterung einhergehen.

Beim *Cockayne-Syndrom* verursacht ein Defekt in *Cockayne Syndrome-A* (CSA) oder *-B* (CSB) Wachstums- und Entwicklungsstörungen, neuronalen Probleme und Fehlbildungen. Bei *Xeroderma pigmentosum* ist eines der 7 Gene für *Xeroderma pigmentosum group A-G complementing protein* (XPA-XPG) betroffen. In der Folge führt Sonnenlicht bereits nach kurzer Einwirkung zu irreparablen Hautschäden und es tritt schon in jungen Jahren Hautkrebs auf.

Der Ablauf der NER kann in 4 Schritte unterteilt werden: Fehlererkennung, Fehlerprüfung, Herausschneiden der Fehlstelle und Neusynthese der entstandenen Einzelstranglücke (siehe Abb. 1.15). Es gibt zwei verschiedenen Formen der NER, die sich nur bei der Fehlererkennung unterscheiden: *global genome NER (GG-NER)* repariert transkriptionell inaktive Stellen im Genom, während *transcription-coupled NER (TC-NER)* Schäden während der Transkription behebt.

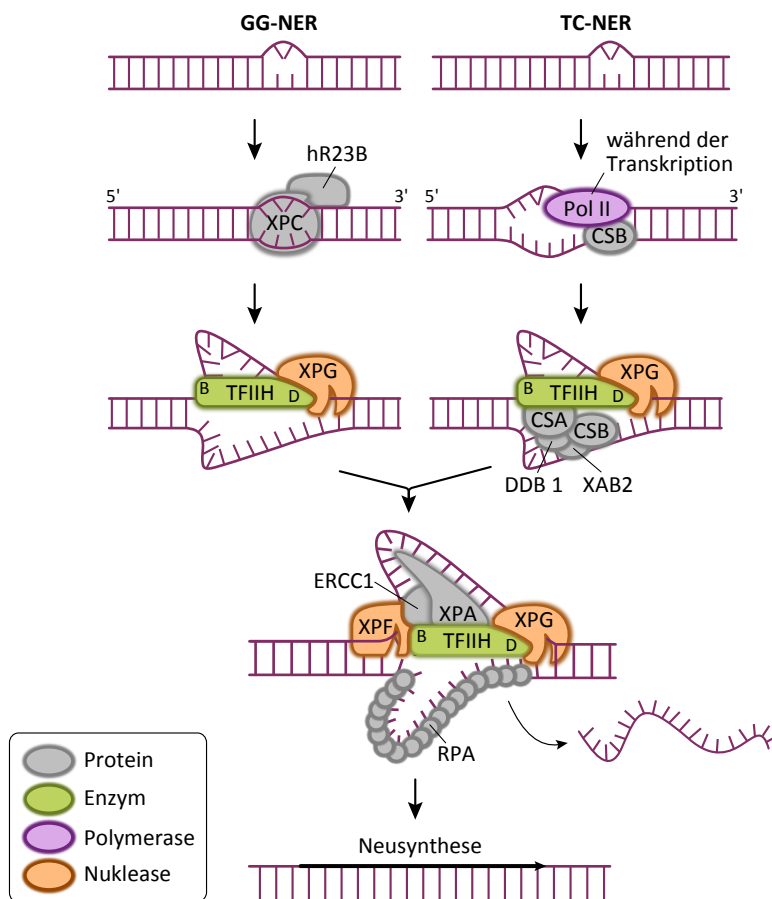


Abbildung 1.15. | Nukleotidexzisionsreparatur. Sperrige Einzelstrangschäden werden durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben. Die TC-NER ist an die Transkription gekoppelt, während die GG-NER genomweit nach Fehlern sucht. Für die folgende Prüfung, Exzision und Neusynthese des fehlerhaften Abschnitts sind die Xeroderma pigmentosum Proteine (XPA-XPG) von zentraler Bedeutung. Quelle: modifiziert nach [102].

Bei der GG-NER ist der XPC-Komplex für die Fehlererkennung zuständig. Er besteht aus XPC und *UV excision repair protein RAD23 homolog B (hHR23B)*. XPC ist ubiquitär in der Zelle vorhanden. Im Zellkern scannt es mit Hilfe seiner Einzelstrang-Affinität die DNA nach ungepaarten Basen ab. Auf diese Weise erkennt der XPC-Komplex ein breites Spektrum an DNA-Schäden, die mit kurzen Einzelstrangabschnitten einhergehen und die Konformation der Doppelhelix stören, z.B. Einzelstrangschleifen, Fehlpaarungsblasen und Einzelstrangüberhänge [106]. Pyrimidin-Dimere werden nicht unmittelbar vom XPC-Komplex erkannt, sondern vom *UV-DDB-Komplex* (bestehend aus *DNA damage-binding protein 1* und *2*, kurz *DDB 1* und *DDB 2*), der anschließend den XPC-Komplex an die Fehlstelle rekrutiert [107].

Bei der TC-NER kommt die Transkription aufgrund der Schadstelle zum Erliegen. Dies wird von CSB erkannt, das während der Elongation zusammen mit dem XPG in ständiger

Wechselwirkung mit der *RNA-Polymerase II (Pol II)* steht. Durch Rekrutierung von CSA und weiteren Faktoren wie DDB 1 und *XPA binding protein-2 (XAB2)* wird Pol II von der Schadstelle entfernt um Platz für die Reparaturenzyme zu schaffen [108].

Die nachfolgenden Schritte verlaufen für GG-NER und TC-NER identisch. Bei der Fehlerprüfung wird verifiziert dass es sich um einen NER-spezifischen Schaden handelt oder die NER wird abgebrochen. Hierbei sind XPA, RPA und *TFIIH* von zentraler Bedeutung [109]. *TFIIH* ist ein Transkriptionsfaktor aus mehreren Untereinheiten, der unter anderem die beiden DNA-Helikasen XPB und XPD enthält [110]. Diese entwinden den Doppelstrang in einem Bereich von ~30 bp um die Schadstelle herum, während RPA den unbeschädigten Einzelstrang stabilisiert und XPA vermutlich den beschädigten Strang auf Deformationen des Rückgrats untersucht.

Im nächsten Schritt schneiden die beiden Endonukleasen XPG und *ERCC1-XPF* den Schaden durch zwei Einschnitte aus dem beschädigten Einzelstrang heraus, so dass eine 24–32 bp große Lücke entsteht. Die Lücke wird schließlich durch Neusynthese und Ligation von der regulären DNA-Replikations-Maschinerie wieder geschlossen.

1.5.4. Fehlpaarungsreparatur

Basenfehlpaarungen entstehen vor allem während der DNA-Replikation, wenn die DNA-Polymerase Nukleotide auslässt (*Deletion*), mehrfach kopiert (*Insertion*) oder nicht-homologe Nukleotide paart. Zum Schutz vor Basenfehlpaarungen verfügen die Polymerasen δ und ϵ über eine *Korrekturlesefunktion*: sie können fehlgepaarte Nukleotide unmittelbar nach dem Einbau erkennen und mit Hilfe ihrer 3'→5' Exonuklease-Aktivität wieder entfernen. Fehlpaarungen, die trotz des Korrekturlesens verbleiben (besonders in hochrepetitiven Sequenzen), können durch *Fehlpaarungsreparatur* (engl. *mismatch repair*, kurz *MMR*) behoben werden. Dabei wird der Umstand genutzt, dass der Sequenzfehler auf dem neu-synthetisierten Strang liegen muss. In *Escherichia coli* wird der Elternstrang anhand seiner Methylierung vom Tochterstrang unterschieden; in letzterem fehlt diese kurze Zeit nach der Synthese noch [111]. Worauf die Unterscheidung in den meisten anderen Prokaryoten und Eukaryoten basiert, ist noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass in Eukaryoten der Tochterstrang anhand des offenen 3'-OH-Endes erkannt wird. Hierbei spielt offenbar die Interaktion der entsprechenden MMR-Proteine mit der Replikationsmaschinerie und insbesondere mit PCNA eine entscheidende Rolle (siehe Abb. 1.16).

Im Menschen sind zwei Heterodimere für das initiale Auffinden der Fehlpaarung verantwortlich: *MutS α* (bestehend aus *MSH2* und *MSH6*) vermittelt hauptsächlich die Reparatur von Einzelbasen-Fehlpaarungen und kurzen Insertionen/Deletionen (*short-patch MMR*), während *MutS β* (bestehend aus *MSH2* und *MSH3*) die Reparatur hauptsächlich bei längeren Insertionen/Deletionen (*Indels*) von bis zu 16 Nukleotiden einleitet. Beide Komplexe bilden eine Ringstruktur um die DNA herum aus, die es ihnen ermöglicht, an der DNA entlangzuwandern und nach Konformationsfehlern zu suchen. Für *MutS α* wurde gezeigt, dass dabei eine helikale Drehbewegung vollzogen wird, bis der Schaden entdeckt ist und *MutS α* stoppt [112]. Durch eine ATP-abhängige Konformationsänderung, die mit der Bindung von *MutL α* einhergeht, löst sich *MutS α* wieder von der Schadstelle (jedoch nicht von der DNA). Hierdurch wandert der *MutS α* –*MutL α* -Komplex in einer schnellen diffusiven Gleitbewegung (ohne helikale Drehung) an der DNA entlang. Warum dies geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt. Möglicherweise erlaubt das Lösen von der Schadstelle die Anhäufung mehrerer

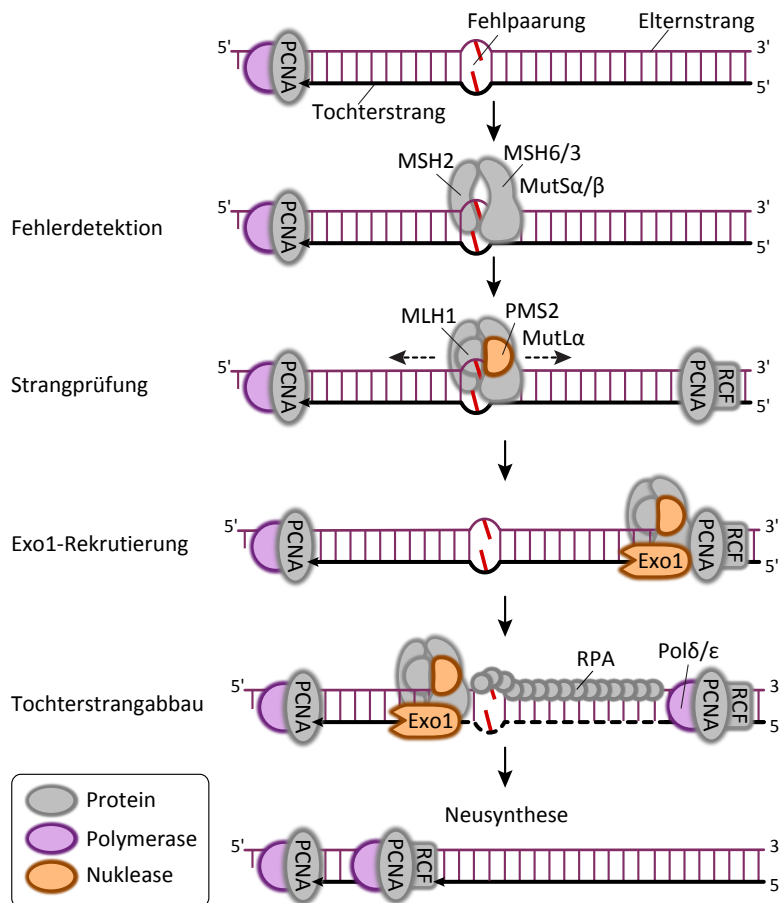


Abbildung 1.16. | Fehlpaarungsreparatur. Für die Reparatur von Basenfehlpaarungen, die während der Replikation der Korrekturlesefunktion der DNA-Polymerasen entgehen, sind die MutS und MutL Komplexe verantwortlich. Mit Hilfe von Exo1 und der Replikationsmaschinerie koordinieren sie den Abbau und die Neusynthese des fehlgepaarten Abschnitts auf dem Tochterstrang. Quelle: modifiziert nach [102].

MutSα–MutLα-Komplexe in der Nähe des Schadens um die Schadensantwort zu verstärken. Es ist außerdem denkbar, dass der MutSα–MutLα-Komplex auf diese Weise nach freien 3'-OH-Enden zur Strangunterscheidung sucht.

Die nachfolgenden Schritte werden durch MutLα koordiniert. Es ist ein Heterodimer aus *MLH1* und *PMS2*, das zum Abbau des fehlgepaarten Tochterstrangsabschnitts die 5'→3' Exonuklease *Exo1* rekrutiert und selbst über eine latente *PMS2*-vermittelte Endonukleaseaktivität verfügt [113]. *Exo1* benötigt als Startpunkt für den Nukleotidabbau einen Einzelstrangbruch, der gegenüber der Schadstelle in 5'-Richtung gelegen sein muss, damit der fehlgepaarte Abschnitt entfernt werden kann. Befindet sich die Fehlpaarung auf dem Folgestrang, so kommen prinzipiell die Enden noch nicht ligierter Okazaki-Fragmente als Eintrittsstelle für *Exo1* in Betracht (woraus außerdem eine intrinsische Tochterstrangspezifität resultiert). Rekonstitutionsexperimente mit aufgereinigten MMR-Proteinen haben gezeigt, dass nur MutSα, *Exo1* und RPA erforderlich sind, um den fehlgepaarten Abschnitt abzubauen, wenn bereits ein 5'-gelegener Einzelstrangbruch existiert [114]. Ist dies nicht der Fall, so sind außerdem MutLα, PCNA und *replication factor C* (*RFC*) erforderlich: *RFC* belädt die DNA mit PCNA und PCNA aktiviert die Endonuklease-Aktivität von MutLα, die dann durch einen 5' des Schadens gelegenen Einschnitt eine Startstelle für den *Exo1*-Abbau erzeugt [115]. Da

PCNA die DNA auf gerichtete Weise umklammert und direkt mit dem MutS–MutL-Komplex (sowie mit Exo1) interagiert, könnte PCNA der entscheidende Faktor für die Tochterstrangspezifität in diesem Szenario sein (und erklären, warum MutS–MutL die Fehlstelle verlässt). Nach Abbau der fehlgepaarten Sequenz inhibieren MutL α und RPA Exo1 und verhindern damit eine übermäßige Hydrolyse. Schließlich erfolgt die Neusynthese und des fehlenden Abschnitts durch die normale Replikationsmaschinerie.

Während der MMR wird der Einbau der Nukleosomen in das Chromatin verzögert, da dies die Reparaturproteine behindern würde. Hierzu interagieren PCNA und MutS α mit dem *chromatin assembly factor 1* (CAF-1). Darüber hinaus spielen einige MMR-Komponenten auch bei weiteren zellulären Prozessen eine Rolle, die im Zusammenhang mit anderen DNA-Reparatursystemen stehen. MutS α hemmt beispielsweise die Rekombination bei unvollkommener Sequenzhomologie [116] und trägt zur Hypervariabilität von Antikörpern bei, indem es (vermutlich mit Hilfe von Exo1 und DNA-Polymerase η) die Mutationsrate in den variablen Bereichen der Immunglobulin-Gene erhöht [117,118]. Außerdem fördert *MutLy* (ein Heterodimer aus den MutL-Homologen *MLH1* und *MLH3*) die Bildung von Crossover-Produkten bei der Rekombination während der Meiose [119].

1.5.5. Weitere Reparaturmechanismen

Einige DNA-Schäden können direkt durch spezialisierte Reparaturproteine behoben werden. Hierzu zählt die *6-O-Methylguanin-DNA-Methyltransferase* (MGMT) [120]. Sie macht die 6-O-Methylierung von Guanin innerhalb der DNA rückgängig, indem sie die Methylgruppe auf einen eigenen Cystein-Rest überträgt. Ein Austausch der Base durch BER ist somit nicht notwendig. Die Reaktion ist stöchiometrisch, da das Protein dabei seine Aktivität verliert.

Ein weiteres Beispiel für direkte DNA-Reparatur stellt die Korrekturlesefunktion einiger DNA-Polymerasen dar, die bereits im Rahmen der Fehlpaarungsreparatur besprochen wurde. Darüber hinaus verfügen viele Organismen aus allen Domänen des Lebens über *Photolyasen*, die im Stande sind Pyrimidin-Dimere ohne die Hilfe von NER aufzulösen [121]. Sie spalten die Quervernetzung durch eine Reduktion der Basen, die an die Oxidation von FADH₂ zu FAD gekoppelt ist (*Photoreaktivierung*). Die Energie für diese Reaktion beziehen die Photolyasen durch Absorption von blauem oder UV-Licht mit ihrem *Antennenkomplex*. Trotz dieser eleganten Lösung, bei der die Schadensursache gleichzeitig für die Reparatur genutzt wird, sind nur wenige höhere Säugetiere bekannt, die über funktionsfähige Photolyasen verfügen [122]. Auch im Menschen sind sie nicht aktiv. Der Grund für den Verlust der Photolyasen während der Evolution ist umstritten.

1.5.6. Fehlertoleranz

Neben den regulären DNA-Polymerasen, die während der Replikation zum Einsatz kommen, gibt es eine Reihe spezieller DNA-Polymerasen, die in der Lage sind, die DNA-Synthese trotz vorhandener Basenschäden fortzusetzen (*translesion synthesis*, kurz *TLS*). Zu ihnen gehören die Polymerasen η , ι , κ , *Rev1*, sowie ζ und die aus der BER bekannte Pol β [123]. Sie besitzen keine Korrekturlesefunktion und zeichnen sich durch ein besonders großes und gut zugängliches aktives Zentrum der Polymeraseaktivität aus. Hierdurch ist eine flexiblere Basenpaarung möglich und selbst sperrige DNA-Addukte können als Matrize genutzt werden. Verschiedene TLS-Polymerasen weisen dabei unterschiedliche Spezifitäten für bestimmte Modifizierun-

gen auf: Polymerase η kann beispielsweise relativ fehlerfrei Pyrimidin-Dimere für die DNA-Synthese nutzen. Auch das Überspringen beschädigter Nukleotide ist möglich; insbesondere können AP-Stellen von Pol β ausgelassen werden, wenn keine rechtzeitige Reparatur durch BER erfolgt ist [124]. Manche Schäden können den aufeinander folgenden Einsatz mehrerer TLS-Polymerasen erfordern. Die Polymerasen ζ und κ dienen vermutlich vor allem der Verlängerung des Tochterstrangs nach Einsatz des Nukleotids gegenüber der Fehlstelle auf dem Elternstrang durch eine fehlerspezifische TLS-Polymerase [125].

TLS ist ein Notfallmechanismus zur vorübergehenden Toleranz von DNA-Schäden während der Replikation, der allein dem Überleben der Zelle dient. Er kann den Zusammenbruch der Replikationsgabel und Folgeschäden wie Translokationen verhindern, steht jedoch in Konkurrenz mit DNA-Reparaturmechanismen, ist relativ fehleranfällig und wirkt daher oft mutagen. Deshalb ist eine strenge Regulation der TLS-Polymerasen wichtig. Nach dem *polymerase-switching Modell* führt die Blockade der Replikationsgabel durch einen DNA-Schaden zur Monoubiquitinierung von PCNA durch ein Heterodimer aus *Rad18* und der E2 Ubiquitin-Ligase *Rad6*. Dies bewirkt die Dissoziation der replikativen DNA-Polymerase im Austausch gegen eine TLS-Polymerase. Nach Überwindung der Fehlstelle wird PCNA wieder deubiquitiniert und der Polymerasetausch rückgängig gemacht, so dass die Aktivität der TLS-Polymerasen auf die Replikations-blockierende Schadstelle begrenzt bleibt [126,127].

Ein alternativer Fehlertoleranzmechanismus, bei dem die Replikation prinzipiell fehlerfrei verläuft, ist der *Matrizenwechsel* (engl. *template switch*). Hierbei pausiert die blockierte (reguläre) Polymerase auf dem einen Elternstrang, während der andere Strang weiter repliziert wird. Letzterer wird anschließend von der blockierten Polymerase verwendet, um die DNA-Synthese fortzuführen. Der Matrizenwechsel geht mit einer Polyubiquitinierung von PCNA einher und verwendet neben eigenen Faktoren auch Enzyme aus der Homologen Rekombination [128]. Wie bei der HRR, basiert der Matrizenwechsel auf Stranginvasion und der Ausbildung und Wiederauflösung von doppelten Holliday-Strukturen [129].

1.6. Biologische Spätfolgen von DNA-Schäden

Können DNA-Schäden über einen längeren Zeitraum nicht repariert werden, so führen die anhaltenden DNA-Schadenssignale in gesunden Zellen zur Aufgabe der Zellteilung (*Seneszenz*) oder zum *programmierten Zelltod*. Dies dient zum Schutz des Organismus vor Mutationen und der Entstehung von Krebs. Der Transkriptionsfaktor p53 ist hierbei als Tumorsuppressor von prominenter Bedeutung.

1.6.1. Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, der sich im Gegensatz zur Nekrose durch einen geregelten Abbau der Zellbestandteile auszeichnet, ohne dass diese sich frei in den extrazellulären Raum ergießen. Morphologisch geht sie mit Zellschrumpfung, Chromatin-Kondensation, dem Verlust der Adhäsion und dem „Blasenwerfen“ der Plasmamembran (*membrane blebbing*) einher. Die Integrität der Zelle wird dabei so lange wie möglich aufrechterhalten, bis schließlich die DNA in Fragmente spezifischer Länge zerschnitten wird, das Zytoskelett abgebaut wird, und die Zelle in einzelne membranumschlossene Vesikel (*apoptotische Körperchen*) zerfällt. Dies verhindert eine unkontrollierte Freisetzung des Zell-

inhalts, der auf Nachbarzellen toxisch wirkt und Entzündungen auslösen kann. Die apoptotischen Körperchen werden anschließend von Makrophagen und/oder benachbarten Zellen über Phagozytose aufgenommen und verdaut. Auf diese Weise können die Grundbausteine der enthaltenen Biomoleküle wiederverwendet werden.

Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus zur schonenden Entfernung von Zellen, die zu schwer beschädigt sind, um sich zu reparieren und eine potenzielle Gefahr für den Organismus darstellen. Daneben ist die Apoptose für eine Reihe weiterer physiologischer Prozesse von großer Bedeutung: während der Entwicklung ermöglicht sie das gezielte Entfernen von Zellen zur Gestaltung der Organe und der Körperform [130], sie gewährleistet die Plastizität des zentralen Nervensystems, bewirkt die Selektion von B- und T-Zellen des Immunsystems und reguliert die Zellzahl in Geweben um die Homöostase aufrechtzuerhalten.

Apoptose kann entweder von externen Signalstoffen ausgelöst werden, die an spezielle *Todesrezeptoren* in der Plasmamembran binden (*extrinsische Apoptose, Typ I*), oder von Stress-vermittelten Signalen innerhalb der Zelle (*intrinsische Apoptose*) über das Mitochondrium (*Typ II*) oder das Endoplasmatische Retikulum (*Typ III*). Alle Wege führen in der Regel zur Aktivierung von *Caspasen* (engl. *cysteiny-l-aspartate specific protease*), einer Familie von Proteinkinasen, die ihre Zielproteine C-terminal von einem Aspartat-Rest zerschneiden (siehe Abb. 1.17). Caspasen sind die Hauptakteure der Apoptose und unterscheiden diese von anderen Formen des programmierten Zelltods. Es gibt *Initiator-Caspasen* (*Caspase-2, -8, -9, -10, -11* und *-12*), *Effektor-Caspasen* (*Caspase-3, -6* und *-7*) und *inflammatorische Caspasen* (*Casp-1, -4* und *-5*), die eine besondere Rolle bei der Reifung von T-Zellen spielen. In der Zelle liegen die Caspasen in ihrer inaktiven Form, als *Pro-Caspasen*, vor. Ihre Aktivierung geschieht durch gezielte proteolytische Spaltung und Zusammenlagerung der Spaltprodukte zum aktiven Enzym. Hierbei kommt es zu einer Aktivierungskaskade, in der zunächst andere Faktoren die Initiator-Caspasen aktivieren, die wiederum die Effektor-Caspasen aktivieren. Letztere aktivieren weitere Effektor-Caspasen, andere Proteasen, wie *Calpaine* und *Cathepsine*, den Chromatin-Kondensationsfaktor *Acinus* und die *Caspase-aktivierte DNase (CAD)*. Außerdem spalten die Effektor-Caspasen Proteine wie *PARP*, *MDC1* [131], *Actin* und *Lamin*. All dies führt schließlich zum Abbau des Zytoskeletts und der DNA, begleitet von den typischen morphologischen Merkmalen der Apoptose.

Extrinsische Apoptose-Induktion

Bei der extrinsischen Apoptose oligomerisieren die Todesrezeptoren (*Fas, TNF-R, DR3, DR4* und *DR5*) nach Bindung ihrer Liganden. Dies bewirkt die Rekrutierung von Adapterproteinen, die zur Aktivierung von Caspase-8 führt (im Fall von *Fas* oder *DR4/5* kann auch Caspase-10 aktiviert werden). Beispielsweise sorgt die Bindung von *Fas antigen ligand (FasL)* für die Bildung von *Fas-Trimeren*, wodurch eine intrazelluläre Domäne entsteht, an die das *Fas-associated death domain protein (FADD)* bindet und *Pro-Caspase-8* rekrutiert. Hierdurch entsteht der *death-inducing signaling complex (DISC)*, der zur Aktivierung von Caspase-8 durch Dimerisierung und Autoproteolyse führt [132].

Intrinsische Apoptose-Induktion

Die intrinsische Apoptose des Typs II kann von einer Vielzahl verschiedener Stressfaktoren mit exo- oder endogener Ursache ausgelöst werden, allen voran DNA-Schäden und oxidati-

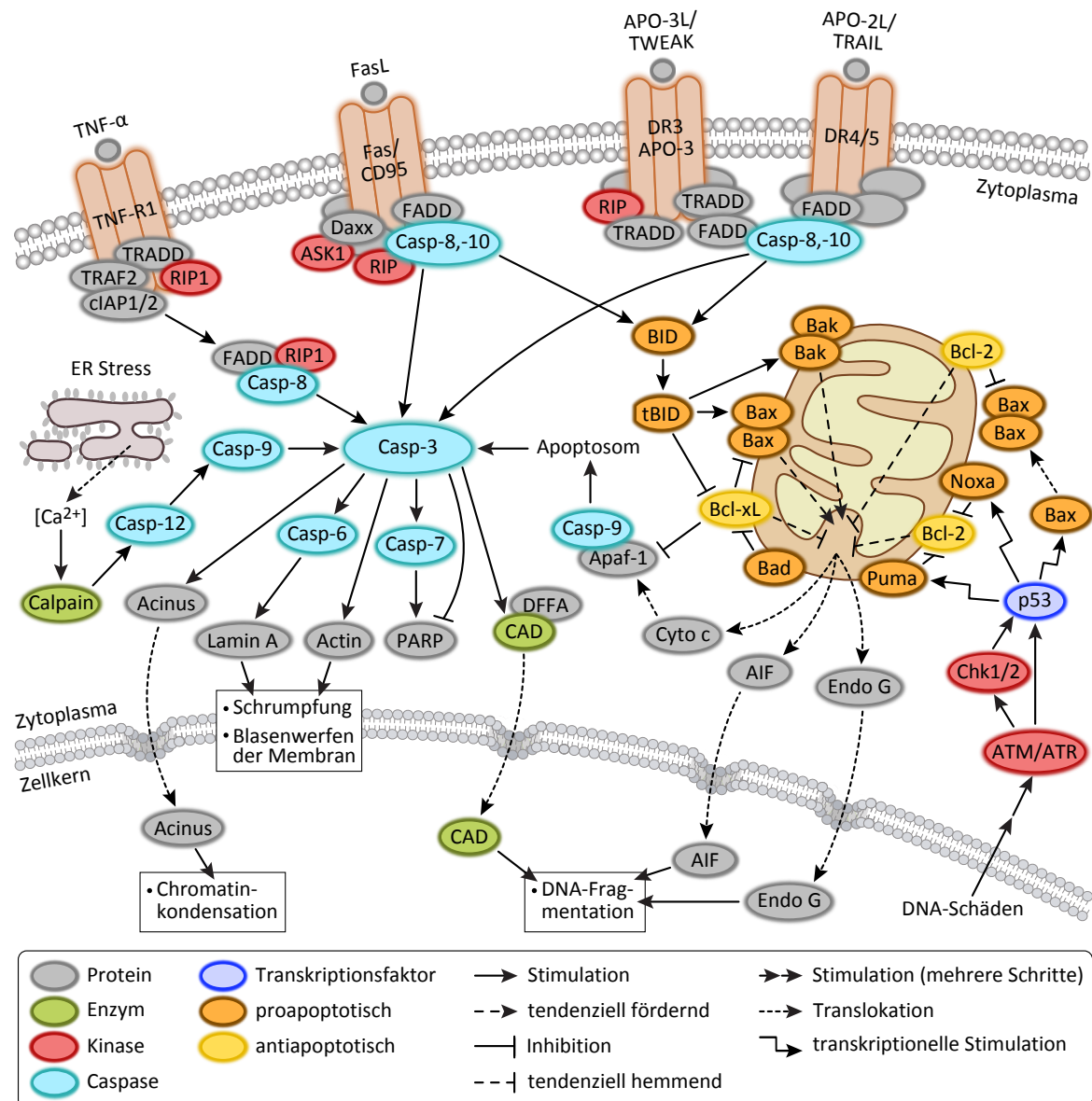


Abbildung 1.17. | Apoptose. Der programmierte Zelltod durch Apoptose wird entweder durch Rezeptoren in der Plasmamembran vermittelt (Typ I), oder durch intrinsische Faktoren, die Prozesse im Mitochondrium (Typ II) oder dem Endoplasmatischen Retikulum (Typ III) in Gang setzen. In der Folge werden Caspasen aktiviert, die das Zytoskelett abbauen und weitere Enzymen aktivieren, die das Chromatin kondensieren und die DNA fragmentieren. Quelle: Cell Signaling Technology (modifiziert).

ver Stress. Hierbei spielen die Proteine der *Bcl-2* Familie eine wesentliche Rolle. Sie kommen in der äußeren Mitochondrienmembran vor und integrieren sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale. *Bcl-2* und *Bcl-xL* zählen zu den wichtigsten antiapoptotischen Komponenten, während *Bad*, *Bid*, *Bak*, *Bax*, *Noxa* und *Puma* die Apoptose fördern. *Bax* ist ein Cofaktor von *p53*, das als Transkriptionsfaktor die Expression von *Bax*, *Puma* und *Noxa* verstärkt. Durch Interaktion mit *Puma* erfährt zytoplasmatisches *Bax* eine Konformationsänderung und wird in die äußere Mitochondrienmembran inkorporiert. Dort binden vermutlich mehrere *Bax* Proteine aneinander und bilden Poren, durch die unter anderem *Cytochrom c* (*Cyto c*) aus dem Mitochondrium austritt. Ab diesem Schritt kann die Apoptose nicht mehr aufgehalten

werden: Cytochrom c verbindet sich im Zytosol mit dem *apoptotic protease-activating factor 1* (*Apaf-1*), das daraufhin eine ATP-abhängige Konformationsänderung erfährt und zu einer Ringstruktur oligomerisiert. Durch Bindung und Aktivierung mehrerer Pro-Caspase-9 Moleküle reift diese Plattform zum *Apoptosom*. Dieses ist in der Lage große Mengen an Caspase-3 und weiteren Effektorcaspasen zu aktivieren. Daneben kann die Freisetzung von *Apoptosis-inducing factor 1* (*AIF*) und *Endonuklease G* (*Endo G*) aus dem Mitochondrium zu untypischen Verläufen der Apoptose ohne Aktivierung von Caspasen führen.

Die Typ III Apoptose ist noch am wenigsten erforscht. Sie stellt eine Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dar und kann durch Glucosemangel, eine Störung des Ca^{2+} -Haushalts, Hypoxie und fehlgefaltete Proteine ausgelöst werden. Diese Form der Apoptose ist in Nervenzellen von besonderer Bedeutung und spielt bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington eine Rolle [133]. ER-Stress kann zur Ausschüttung großer Mengen von Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol führen. Wie bei der Mitochondrien-vermittelten Apoptose sind dabei die Bcl-Proteine Bax und Bak involviert [134]. In der Folge aktiviert die Calcium-abhängige Cysteinprotease *Calpain* Caspase-12, durch die Caspase-9 und schließlich die Effektor-Caspasen aktiviert werden [135,136]. Daneben wurde in embryonalen Mausfibroblasten ein alternativer Weg nachgewiesen, bei dem p53 die Transkription von Puma und Noxa verstärkt und den mitochondrialen Weg der Apoptose mit Ausbildung des Apoptosoms in Gang setzt [137].

Es gibt auch eine Verbindung zwischen Typ I und Typ II Apoptose: In manchen Zellen reicht die Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 nicht aus, um die Effektor-Caspasen in ausreichendem Maß für den Abschluss der Apoptose zu aktivieren. In diesem Fall kann Caspase-8 Bid zu *truncated Bid* (*tBid*) zerschneiden, das Bcl-xL inhibiert und die mitochondriale Apoptose einleitet.

Künstliche Apoptose-Induktion

Es gibt eine Reihe künstlicher Substanzen, die zur gezielten Induktion der Apoptose im Rahmen der Krebstherapie verwendet werden. In dieser Arbeit wurden zwei dieser Substanzen für experimentelle Zwecke verwendet: SuperKillerTRAIL und MG132. SuperKillerTRAIL ist ein besonders potenter Ligand der Todesrezeptoren DR4 und DR5, der den extrinsischen Weg der Apoptose auslöst. Es handelt sich um ein in *Escherichia coli* rekombinant hergestelltes Peptid, das die extrazelluläre Domäne des humanen *Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden* (*TRAIL*) enthält. Durch eine künstlich eingefügte Mutation stabilisiert eine zusätzliche Cystin-Brücke die Zusammenlagerung der TRAIL-Rezeptoren zu ihrer aktiven, multimeren Form.

MG132 ist ein kleines modifiziertes Peptid, das die Plasmamembran eukaryotischer Zellen überwinden kann und als starker, reversibler Proteasom-Inhibitor wirkt. Es reduziert die Degradierung ubiquitinerter Proteine und leitet den ER-Stress-vermittelten intrinsischen Weg der Apoptose (Typ III) ein.

1.6.2. Autophagozytose

Eine andere Form des programmierten Zelltods kann die Autophagozytose darstellen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Autophagozytose ein Recyclingsystem der Zelle, das zur Erneuerung verschiedener Zellbestandteile dient, einschließlich ganzer Zellorganellen [138].

In einem Vesikel-basierten Prozess werden alte Zellkomponenten abgebaut und als Bausteine für neue Biomoleküle wiederverwendet [139]. Die Autophagozytose beseitigt damit beschädigte und potenziell gefährliche Stoffe und gewährleistet die dauerhafte Funktionsfähigkeit der Zelle. Dies ist vor allem in den langlebigen Nervenzellen von großer Bedeutung [140]. Bei Nährstoffmangel hilft die Autophagozytose der Zelle ihren Energiebedarf zu vermindern und „gesundzuschrumpfen“. Daneben können durch Autophagozytose auch Fremdstoffe in der Zelle, bis hin zu Viren und Bakterien abgebaut werden. Diesen Zellüberlebens-fördernden Aufgaben der Autophagozytose steht ihre Rolle bei der Beseitigung nicht zu rettender Zellen zum Wohl des Gesamtorganismus gegenüber [141].

Es werden 3 Mechanismen unterschieden: *Makro-*, *Mikro-* und *Chaperon-vermittelte Autophagozytose*. Bei der Chaperon-vermittelten Variante befördert *Hsc70* Proteine mit einem spezifischen Erkennungsmotiv mit Hilfe des *lysosome-associate membrane protein 2A (LAMP-2A)* zur Verdauung in das Innere eines Lysosoms [142]. Bei der Mikroautophagozytose umschließt das Lysosom direkt das zu verdauende Material innerhalb des Zytosols [143]. Größere Zellkomponenten werden über den Hauptweg, die Makroautophagozytose, abgebaut [144]. Im Rahmen dieser Arbeit ist nur dieser Weg von Bedeutung und wird im Folgenden synonym mit dem allgemeinen Begriff „Autophagozytose“ verwendet.

Die Makroautophagozytose ist durch Ausbildung des *Autophagosoms* charakterisiert, einem Doppelmembran-Vesikel, das aus einer offenen *Isolationsmembran* hervorgeht (siehe Abb. 1.18). Die Isolationsmembran (auch *Phagophore* genannt) entstammt vermutlich dem ER. Sie umschließt die abzubauen Struktur und reift dadurch zum Autophagosom. Dieses verschmilzt anschließend mit einem Lysosom zum *Autolysosom* (vorher kann es noch mit Endosomen verschmelzen). Die innere Membran zerfällt, so dass ihr Inhalt mit den lysosomalen Verdauungsenzymen in Kontakt kommt und abgebaut wird. Die Kernkomponenten für die Bildung des Autophagosoms sind die *Atg-Proteine* [145]. Sie lassen sich in mehrere funktionale Einheiten einteilen, die für verschiedene Schritte der Autophagosom-Reifung erforderlich sind: für die Keimung der Isolationsmembran sind der *ULK1-* und der *PI3K-Komplex* wichtig; für ihre Erweiterung um die abzubauen Struktur herum sorgt das *Atg12-Konjugationssystem*, und die Schließung des Autophagosoms wird durch das *LC3-Konjugationssystem* vermittelt.

Der ULK1-Komplex enthält die namensgebenden *Unc-51-like kinase 1* (auch *Atg1* genannt), *Atg13* und das Gerüstprotein *FIP200*. Der Komplex ist eine wichtige Regulationsschnittstelle für die Autophagozytose: er wird von der Serin/Threonin-Proteinkinase *mTOR* gehemmt, und durch die *AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)* gefördert [146]. Über *mTOR* werden der *PI3K-I / Akt Signalweg*, der *MAPK / Erk1/2 Signalweg* und *p53-vermittelte DNA-Schadenssignale* integriert. *AMPK* erkennt Defizite im Energiehaushalt der Zelle anhand des *AMP/ATP-Verhältnisses* und fördert die Autophagozytose durch Aktivierung von *ULK1* und Hemmung von *mTOR*. Der *PI3K-Komplex* enthält die *Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K type 3)*, ihr Adapterprotein *p150*, sowie *Atg14* und *Beclin-1*. Letzteres ist mit *Bcl-2* verwandt und interagiert mit diesem, wodurch *Bcl-2* nicht nur die Apoptose, sondern auch die Autophagozytose hemmt. *Beclin-1* trägt zur Entscheidung zwischen Apoptose und Autophagozytose bei, indem es selbst antiapoptotisch wirkt und gleichzeitig ein Zielprotein für den proteolytischen Abbau durch Caspasen darstellt [147].

Das *Atg12-Konjugationssystem* setzt sich aus *Atg5*, *Atg7*, *Atg10*, *Atg12* und *Atg16L1* zusammen. Es bildet ein *Atg5–Atg12–Atg16L1-Homodimer*, das an der äußeren Schicht der

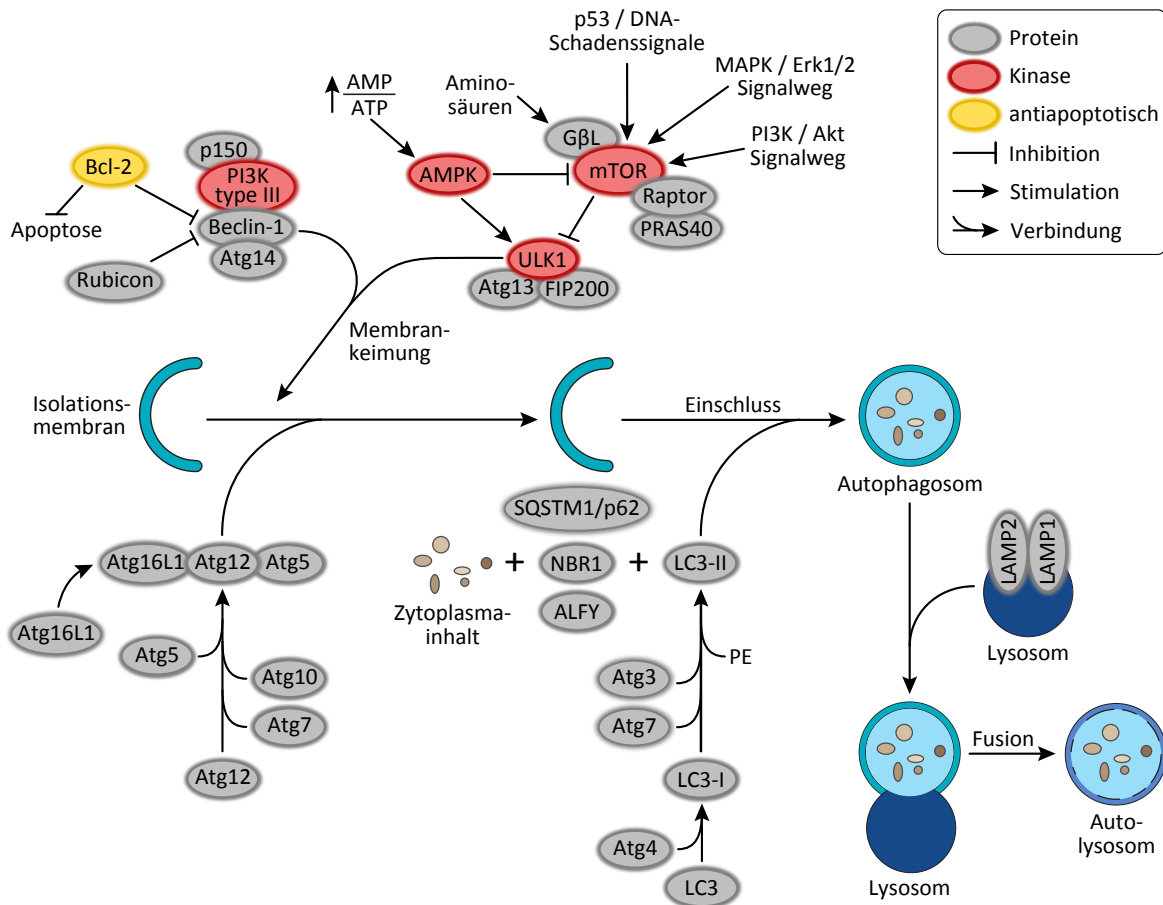


Abbildung 1.18. | Makroautophagozytose. Regulation und Reifung des Autophagosoms bis zur Verschmelzung mit einem Lysosom zum Autolysosom, in dem die abzubauenen Substanzen schließlich verdaut werden. Quelle: Cell Signaling Technology (modifiziert).

Isolationmembran lokalisiert ist und während der Schließung zum Autophagosom wieder von dieser dissoziiert. Der Atg12-Komplex ist essentiell für die Lipid-Modifizierung von *microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)*, die zur Schließung des Autophagosoms führt. [148]. Nach posttranslationaler Modifizierung von LC3 durch die Cystein-Protease *Atg14* entsteht zunächst die zytosolische Form *LC3-I*. Sie wird von *Atg3* und *Atg7* durch Anheftung von Phosphatidylethanolamin (PE) in die Autophagosom-assoziierte Form *LC3-II* konvertiert. Diese Konvertierung ist ein spezifischer Marker für die Autophagozytose und kann (wie hier) mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen werden: trotz der höheren molaren Masse migriert LC3-II aufgrund des Lipids während der Gelelektrophorese schneller (16 kDa scheinbare Masse) als LC3-I (18 kDa scheinbare Masse), so dass sich bei aktiver Apoptose eine Doppelbande zeigt.

1.6.3. Seneszenz

Wenn Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren ohne abzusterben, gehen sie in *Seneszenz* [149]. Dies betrifft unter physiologischen Bedingungen alle vollständig ausdifferenzierten Körperzellen. In vitro zeigt sich außerdem, dass Primärzellen seneszent werden, sobald sie ihre, im Allgemeinen durch die Telomerlänge vorgegebene, maximale Anzahl an Zellteilungen

überschreiten. Daneben können pathogene Einflüsse wie DNA-Schäden zur vorzeitigen Seneszenz führen. Die Zellen steigen über den p53-p21 Signalweg während der G1-Phase aus dem Zellzyklus aus und begeben sich in die *G0-Phase*.

Manche Autoren bezeichnen den Eintritt in die G0-Phase als einen besonders lang anhaltenden Zellzyklusarrest; tatsächlich unterscheiden sich G0-Zellen jedoch in ihrer Morphologie, Stoffwechselaktivität und Genexpression von normalen, vorübergehend ruhenden oder kontaktinhibierten G1-Zellen: G0-Zellen sind unter anderem größer (erhöhtes Zytoplasmavolumen im Vergleich zum Zellkern) [150], weisen eine erhöhte Aktivität der β -Galactosidase auf [151] und exprimieren nicht den Proliferationsmarker *Ki-67* [152]. Außerdem schützt der Eintritt in die G0-Phase die Zellen vor dem programmierten Zelltod, ganz im Gegensatz zum Arrest in den Zellzyklusphasen, der mit fortschreitender Dauer den zellulären Selbstmord fördert. Neuere Studien weisen darauf hin, dass neben dem klassischen Eintritt in die Seneszenz aus der G1-Phase heraus auch G2-Zellen seneszent werden können [153].

1.7. Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Fluoreszenzmikroskop verwendet, das zwei supraauflösende Mikroskopietechniken in einem Gerät vereint [154]. Die *Auflösung* eines Mikroskops ist ein Maß dafür, wie detailreich es feine Strukturen abbilden kann. Umgekehrt betrachtet, gibt die Auflösung an, wie klein die Unterschiede zwischen den Bestandteilen eines Objekts minimal sein dürfen, damit sie sich in der optischen Abbildung noch voneinander trennen lassen. Es gibt verschiedene Kriterien, nach denen sich diese Grenze angeben lässt, und oft hängt es von der Problemstellung ab, welches Kriterium am wichtigsten ist (siehe Übersichtsartikel [155]). Beispielsweise kann die Größe oder die Form eines einzelnen Objekts von Interesse sein, oder aber die Anzahl und Konformation der Objekte, aus denen sich eine größere Struktur zusammensetzt. Im einen Fall ist es wichtig zu wissen, wie groß das Objekt mindestens sein muss, damit es maßstabsgerecht abgebildet werden kann; im anderen Fall ist es wichtiger den minimalen Abstand zu kennen, den zwei Objekte mindestens haben müssen, damit sie voneinander unterschieden werden können.

Das historisch erste und nach wie vor gebräuchlichste Kriterium der optischen Auflösung in der Bildebene (lateral) hat Ernst Abbe im Jahr 1873 definiert [156]. Das Abbe-Kriterium (1.3) gibt den minimalen Abstand an, den die Linien eines optischen Gitters aufweisen müssen, damit sie getrennt voneinander abgebildet werden können. Für den Spezialfall selbstleuchtender Objekte, die bei der Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz kommen, ist außerdem das *Rayleigh-Kriterium* (1.4) von Bedeutung.

$$d_{\text{Abbe}} \geq \frac{\lambda_0}{2 NA}, \quad NA = n \sin \alpha$$

d_{Abbe}	Kleinster Objektabstand nach Abbe	(1.3)
λ_0	Wellenlänge des betrachteten Lichts im Vakuum	
NA	Numerische Apertur des Objektivs	
n	Brechungsindex	
α	Objektseitiger Öffnungswinkel des Objektivs	

$$d_{\text{Rayleigh}} \geq \frac{0,61 \lambda_0}{NA}$$

d_{Rayleigh}	Kleinster Objektabstand nach Rayleigh	(1.4)
-----------------------	---------------------------------------	-------

In der Praxis ergeben sich nach Abbe und Rayleigh ähnliche Werte, wonach konventionelle Mikroskope im besten Fall Strukturen auflösen können, die nicht kleiner sind als die halbe Wellenlänge des von ihnen ausgehenden Lichts. In der optischen Mikroskopie kommen Wellenlängen unterhalb von 400 nm nicht vor, da kurzwelligeres Licht außerhalb des sichtbaren Spektrums liegt, von konventionellen Linsen kaum oder gar nicht transmittiert wird und keine geeigneten Fluorophore zur Verfügung stehen. Deshalb liegt die laterale Auflösungsgrenze konventioneller Mikroskope bestenfalls bei ~ 200 nm.

Die große Bedeutung des Abbe-Kriteriums liegt darin, dass es eine fundamentale Grenze für die Leistungsfähigkeit eines optischen Systems angibt, die sich mit Hilfe der geometrischen Optik nicht erklären lässt. Abbe war der Erste, der erkannte, dass die Beugung des Lichts dafür verantwortlich ist, dass sich die Struktur eines Objekts nicht beliebig genau abbilden lässt (*Beugungsgrenze*). Tritt eine Lichtwelle durch das Linsensystem eines Mikroskops, so erfährt sie eine *Apertur*, die sowohl durch die Wellenlänge des Lichts, als auch durch die Eigenschaften der Linsen bestimmt ist (in der Praxis spielt außerdem der Brechungsindex der Probe und des Mediums zwischen Probe und Objektiv eine Rolle). Aus einem punktförmigen Lichtsignal entsteht in der Bildebene ein verschmierter Lichtfleck, der von Beugungsringen umgeben ist.

Das 3-dimensionale Beugungsmuster eines punktförmigen Objekts wird *Punktbildfunktion* oder *Punktspreizfunktion* (engl. *point spread function*, kurz *PSF*) genannt. Die PSF ist charakteristisch für die Abbildungseigenschaften und somit das Auflösungsvermögen eines optischen Systems. Das Gesamtbild entsteht durch Faltung des vom Objekt ausgehenden Lichts mit der PSF (siehe Abb. 1.19); es kommt also zur Überlagerung eng benachbarter Lichtsignale und außerdem existiert eine Mindestgröße der abgebildeten Lichtflecke, die unabhängig von der tatsächlichen Objektgröße nicht unterschritten werden kann. Für Objekte, die kleiner sind als die Auflösung, können deshalb weder Aussagen über die genaue Größe, noch über ihre Form getroffen werden.

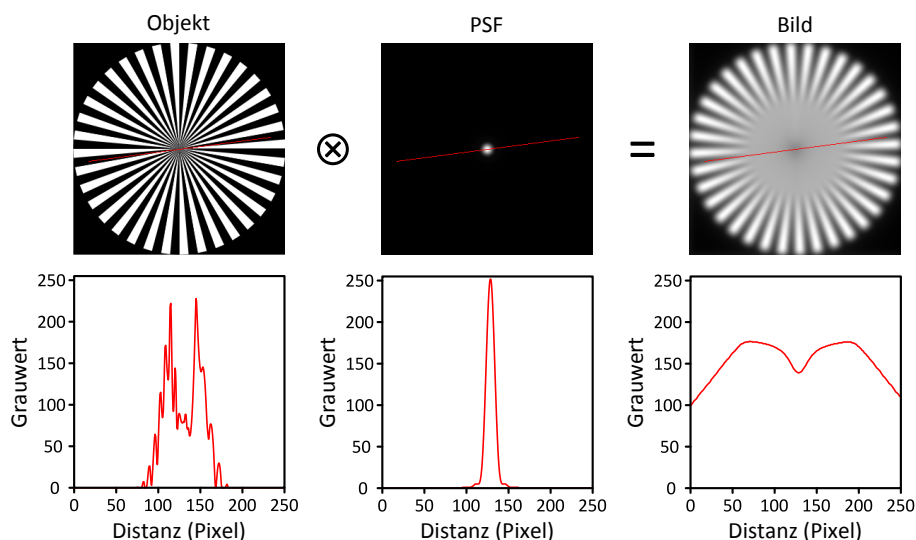


Abbildung 1.19. | PSF und mikroskopische Abbildung. Ein mikroskopisches Bild entsteht durch Faltung des betrachteten Objekts (hier ein Siemensstern) mit der Punktbildfunktion (PSF) des optischen Systems. Dies bewirkt eine Unschärfe der Objektstrukturen und begrenzt die Auflösung. Feine Objektetails gehen verloren, wie auch die Grauwertprofile von links nach rechts entlang der roten Linie zeigen.

Aufgrund seines fundamentalen Charakters, galt das Abbe-Kriterium über ein Jahrhundert lang als unüberwindbar. Erst in den vergangenen zwei Jahrzehnten hat sich gezeigt, dass es Möglichkeiten gibt, das Abbe-Kriterium zu umgehen (ohne es zu brechen!). Mittlerweile existieren verschiedene Techniken, die dies bewältigen. Sie werden unter dem Begriff *superauflösende Mikroskopie* zusammengefasst, oder auch *superauflösende Fluoreszenzmikroskopie*, da es sich im Wesentlichen um Fluoreszenztechniken handelt. Für eine ausführliche Abhandlung über die Entstehungsgeschichte der superaflösenden Mikroskopie sei auf [155] verwiesen.

Alle superaflösenden Mikroskopietechniken beruhen auf der Schaffung besonderer Beobachtungsbedingungen, für die das Abbe-Kriterium nur eingeschränkt zutrifft. Wie Abbe selbst bereits in seiner Veröffentlichung bemerkte, gilt sein Theorem nämlich nur unter ganz speziellen Voraussetzungen (die lange für unabänderlich gehalten wurden), und zwar der Weitfeldmikroskopie mit homogener Beleuchtung ohne spektral und/oder zeitlich getrennte Detektion verschiedener Objektbestandteile. Folglich gibt es einige prinzipiell verschiedene Strategien, bei denen superaflösende Mikroskopietechniken ansetzen:

- Minimierung des effektiven Beleuchtungsquerschnitts, beziehungsweise -volumens auf Ausmaße unterhalb der Auflösungsgrenze (Verkleinerung der effektiven PSF)
- spektral und/oder zeitlich getrennte Detektion einzelner Fluoreszenzmoleküle zu ihrer genauen Lokalisierung unter Ausnutzung der Form der PSF zur Schwerpunktbestimmung (*Lokalisationsmikroskopie*)
- Erweiterung des abbildbaren Informationsgehalts durch geeignete Modulation der Beleuchtung

Grundsätzlich können *Fernfeld-* und *Nahfeld-*Methoden unterschieden werden (siehe Tab. 1.1). Nahfeldmikroskope machen sich durch einen sehr geringen Arbeitsabstand die besonderen Eigenschaften der PSF in unmittelbarer Nähe der Fluorophore zu Nutze. Sie eignen sich nur für die Betrachtung von Oberflächen und rastern diese mit sehr feinen Sonden ab. Fernfeldmikroskope haben größere Arbeitsabstände und erfassen entweder einen großen Bildausschnitt auf einmal (*Weitfeldmikroskopie*) oder rastern das Präparat ebenfalls Punkt für Punkt ab (wie im Fall des *Konfokalmikroskops*, das jedoch nicht zu den superaflösenden Techniken zählt).

Tabelle 1.1. | Superauflösende Mikroskopietechniken. Einteilung der wichtigsten Technologien nach dem Prinzip der Auflösungsverbesserung.

	Prinzip der Auflösungsverbesserung		
	Verkleinerung der eff. PSF	Einzelmolekül-Lokalisierung	Beleuchtungsmodulation
Fernfeld	—	GSDIM PALM/FPALM SPDM/SPDM _{PhyMod} STORM/dSTORM	SIM SMI STED/CW-STED
Nahfeld	SNOM/NSOM	—	—

Beide hier verwendeten Techniken sind Weitfeldmethoden. Es handelt sich um *spectral precision distance microscopy with physically modifiable fluorochromes (SPDM_{PhyMod})*, eine Varian-

te der Lokalisationsmikroskopie, und *structured illumination microscopy (SIM)*, eine Technik, die auf der Erweiterung des abbildbaren Informationsgehalts durch strukturierte Beleuchtung beruht.

1.7.1. Lokalisationsmikroskopie (SPDM_{PhyMod})

SPDM_{PhyMod} nutzt ein nicht-lineares Fluoreszenzphänomen aus, um einzelne Fluorophore zeitlich getrennt voneinander zu detektieren [157–159]. Die Probe wird mit Laserlicht hoher Intensität beleuchtet, so dass die Fluorophore innerhalb kurzer Zeit ausbleichen. Im Gegensatz zu dem unerwünschten Bleicheffekt bei konventioneller Fluoreszenzmikroskopie, kehrt jedoch ein Teil der Fluorophore stochastisch nach einem Zeitraum zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten in den fluoreszierenden Zustand zurück (*reversibles Bleichen*). Sie erscheinen dann kurz als helle Lichtpunkte (einer direkten Abbildung der PSF) im sonst dunklen Blickfeld, bevor sie erneut ausbleichen. Hierfür ist eine geeignete photochemische Umgebung in der Probe notwendig. Das photochemische Prinzip hinter diesem Blinkphänomen ist noch weitgehend unverstanden; es tritt jedoch bei vielen Fluorophoren auf und hängt sowohl von der chemischen Natur des Fluorophors, als auch des Eindeckmediums ab (für einige Fluorophorgruppen wurden bereits verschiedene Mechanismen vorgeschlagen [160–162]).

Die stochastische Natur des Blinkens führt zu einer zeitlichen Trennung der Einzelmolekülsignale und somit auch zu ihrer optischen Isolierung. Mit Hilfe von Gauß-Fits (oder anderen Näherungen an die PSF) kann so die Position der einzelnen Fluorophore bis auf wenige Nanometer genau bestimmt werden, selbst wenn ihre räumliche Distanz weit unterhalb der Auflösungsgrenze liegt (wir erreichen typischerweise Lokalisationsgenauigkeiten von 10–20 nm, abhängig vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis). Das Blinken der Fluorophore wird durch die Aufnahme vieler Bilder in kurzer Abfolge verfolgt (wir erstellen typischerweise 1000–2000 Bilder im Abstand von 50–100 ms). Aus der gewonnenen Positionsinformation kann schließlich ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert werden, wobei verschiedene Visualisierungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen [163].

Im einfachsten Fall werden die Signalpositionen als helle Pixel in ein Bild eingetragen. Um die Unsicherheit der Positionsbestimmung zu berücksichtigen, kann die Intensität dieser Pixel im Radius der Lokalisationsgenauigkeit Gauß-förmig verschmiert werden. Aufwändigere Visualisierungsmethoden versuchen anstelle der einzelnen Signalpositionen, die Signaldichte wiederzugeben. Hierdurch entsteht ein natürlicheres Bild, weil Intensitätsunterschiede auf ähnliche Weise gewichtet werden wie bei konventioneller Weitfeldmikroskopie. Eine solche Methode ist die hier verwendete *Triangulations-Visualisierung*: Das Bild wird durch Verbinden von Triplets benachbarter Signalpositionen zu Dreiecken gerendert. Die jedem Dreieck zugewiesene Intensität ist invers proportional zu seiner Fläche, und repräsentiert somit die lokale Signaldichte. Das Bild wird anschließend geglättet, indem die Triangulation viele Male (hier 100–1000x) mit zufällig veränderten Signalpositionen wiederholt und mit dem vorherigen Bild überlagert wird. Die Signalpositionen werden dabei nur innerhalb eines vorgegebenen Radius verändert, der wiederum von der lokalen Signaldichte abhängt (hier wurde die mittlere Distanz zu den nächsten 4 Nachbarsignalen verwendet).

Der große Vorteil der Lokalisationsmikroskopie liegt nicht allein in der starken Verbesserung der Auflösung, sondern auch in der Verfügbarkeit der Positionsinformation. Diese kann zur Analyse von Signaldistanzen und Nachbarschaftsbeziehungen genutzt werden, um

beispielsweise die Bildung von Proteinclustern wie Rezeptoren und Ionenkanäle zu untersuchen. Eine Besonderheit des hier angewandten SPDM_{phy}mod Verfahrens im Vergleich zu anderen Varianten der Lokalisationsmikroskopie liegt darin, dass sowohl *in vitro*, als auch *in silico* die Mehrfachdetektion individueller Fluorophore möglichst vermieden wird. Dazu werden Eindeckmedien und Beleuchtungsintensitäten verwendet, die mehrfaches Blinken hemmen. Zudem werden geeignete Filter-Algorithmen angewandt um eventuelle Mehrfachdetektionen desselben Moleküls aufgrund von langanhaltenden (ggf. „flackernden“) Fluoreszenzereignissen über mehrere Einzelbildaufnahmen hinweg (*Multiframe-Signale*) zu berücksichtigen. Methoden wie dSTORM begünstigen explizit eine möglichst häufige Detektion der Fluorophore [164]. Das erhöht zwar die Signalausbeute, hat aber den Nachteil, dass es zu Problemen bei quantitativen Analysen kommen kann.

1.7.2. Strukturierte Beleuchtung

Bei der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung wird die Probe nicht homogen ausgeleuchtet, sondern mit einem periodisch modulierten Intensitätsmuster [165–167]. Meist (wie auch hier) handelt es sich um ein Streifenmuster mit sinusförmig schwankender Helligkeit, das durch Interferenz zweier kohärenter Laserstrahlen erzeugt wird [168]. Um zu verstehen, wie eine solche Beleuchtungsform zur Verbesserung der Auflösung beiträgt, ist es hilfreich, die optische Abbildung eines Objekts im Frequenzraum zu betrachten [165]. Mit Hilfe der *Fourier-Transformation* lässt sich jedes Objektdetail im Ortsraum als Summe von harmonischen Funktionen mit unterschiedlichen *Ortsfrequenzen* beschreiben. Je höher die Frequenz ist, desto feiner sind die Objektdetails, die sie repräsentieren.

Nach dieser Betrachtungsweise lässt sich die optische Abbildung als Übertragung eines frequenzmodulierten Signals auffassen, bei dem das Mikroskop als Hochpassfilter wirkt. Wie stark die verschiedenen Ortsfrequenzen zur Informationsübertragung beitragen, wird durch die *optische Übertragungsfunktion* (engl. *optical transfer function*, kurz *OTF*) beschrieben: sie entspricht der Fourier-Transformation der PSF. Die *Grenzfrequenz*, bei der die OTF ihren Nullpunkt erreicht, entspricht der Auflösung nach Abbe (man bemerke die Analogie zwischen dem minimal darstellbaren Gitterabstand und der maximal übertragbaren Gitterfrequenz).

Durch Überlagerung der strukturierten Beleuchtung mit dem Objekt entsteht ein *Moiré-Muster* [169], ähnlich wie bei der Überlagerung zweier leicht gegeneinander verdrehter Gitter oder zweier Gitter mit leicht verschiedenem Gitterabstand (siehe Abb. 1.20). Die Gitterfrequenz des Moiré-Musters ist kleiner als die Frequenz beider Muster, aus denen es entsteht. Durch diesen Effekt ist die strukturierte Beleuchtung in der Lage, Ortsfrequenzen jenseits der Grenzfrequenz in das übertragbare Frequenzband der OTF zu verschieben (siehe Abb.

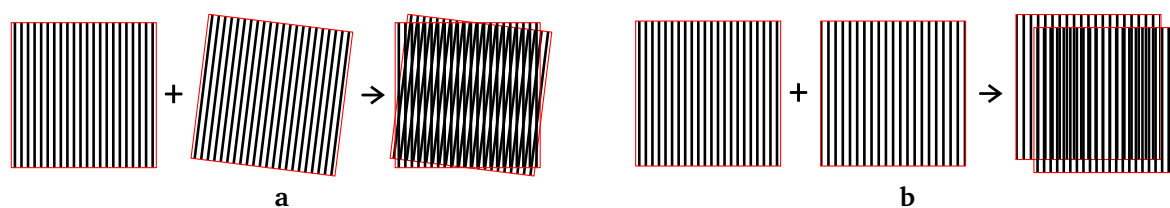


Abbildung 1.20. | **Moiré-Effekt.** Bei der Überlagerung zweier leicht gegeneinander verdrehter Gitter (a) oder zweier Gitter mit leicht verschiedenem Gitterabstand (b) entsteht ein neues Streifenmuster mit kleinerer Gitterfrequenz (Moiré-Muster).

1.21). Die Auflösung lässt sich hierdurch in jeder Raumrichtung verdoppeln [169], wenn die Gitterfrequenz des Beleuchtungsmusters der Grenzfrequenz der OTF entspricht (zur Verbesserung der axialen Auflösung kann durch 3-Strahl-Interferenz ein Intensitätsmuster erzeugt werden, das auch entlang der optischen Achse moduliert ist [170]). Zusätzlich wird der Kontrast erhöht, da Frequenzen nahe der Grenzfrequenz stärker gewichtet werden als ohne strukturierte Beleuchtung. Dieser Aspekt ist oft von größerer Bedeutung für den nutzbaren Informationsgehalt des mikroskopischen Bilds als die Auflösungsverbesserung selbst.

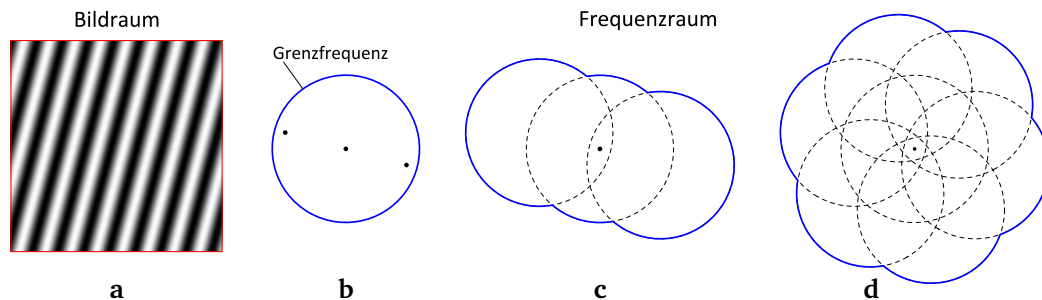


Abbildung 1.21. | SIM-Prinzip. Das sinusförmige Beleuchtungsmuster (a) enthält 3 Spitzen im Frequenzraum (b), der als Polardarstellung abgebildet ist und den winkelabhängigen Informationsgehalt des Objekts bei radial von der Mitte aus wachsender Frequenz zeigt. Die Spitze in der Mitte entspricht der 0. Ordnung der Gitterfrequenz (0 Hz), die beiden äußeren entsprechen der 1. Ordnung. Der blaue Umriss steht für die Grenzfrequenz der OTF. Durch Verschiebung des Beleuchtungsgitters über das Objekt hinweg lässt sich dank des Moiré-Effekts die Grenzfrequenz entlang der Bewegungsrichtung erweitern (c), bis hin zu einer Verdopplung der übertragbaren Bandbreite. Um eine isotrope Auflösungsverbesserung zu erhalten, muss das Gitter außerdem gedreht werden (d). Quelle: modifiziert nach [168].

Um lateral eine isotrope Auflösung zu erzielen, muss das Beleuchtungsgitter in gleichen Winkelabständen gedreht werden (üblicherweise werden 3 Rotationswinkel im Abstand von 60° gewählt). Außerdem muss das Gitter durch Modulation der Phase über das Objekt gescannt werden. Bei mindestens 3 Phasenpositionen und 3 Rotationswinkeln müssen für ein Bild also mindestens 9 Aufnahmen gemacht werden. Für ein 3D-Bild muss diese Sequenz für jede Position entlang der optischen Achse wiederholt werden. Aus den Einzelbildern kann anschließend ein hochaufgelöstes Bild erzeugt werden. Dazu ist allerdings ein aufwändiges Rekonstruktionsverfahren nötig [171,172], bei dem zunächst die einzelnen Komponenten (*Ordnungen*) des Moiré-Musters voneinander getrennt werden, um dann die Objektfrequenzen zu isolieren, an ihren ursprünglichen Platz im Frequenzband zurückzuschieben und schließlich zu einem einzelnen Spektrum zusammenzufügen.

2

MATERIALIEN UND STANDARMETHODEN

2.1. Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	TE124S	Sartorius
Feinwaage	Scout Pro	Ohaus
Glasgeräte, div. Volumina	Bechergläser, Messzylinder, ...	SCHOTT
Kolbenhubpipetten, div. Volumina	Eppendorf Research/Reference	Eppendorf
Kolbenhubpipetten, div. Volumina	PIPETMAN Classic	Gilson
Kühlzentrifuge	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech
Magnetrührer mit Heizung	MR Hei-Standard	Heidolph
Mikrozentrifuge, ungekühlt	Heraeus Pico 21	Thermo Scientific
Mikrozentrifuge, gekühlt	Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
pH-Elektrode mit Temperatursensor	SE100 N	Knick
pH-Messgerät	pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences
Taumler (Plattformschüttler)	Polymax 1040	Heidolph
Vortex-Mixer	Vortex-Genie 2	neoLab Migge

2.2. Zellkultur

2.2.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Forma Steri-Cycle CO ₂	Thermo Scientific
Einfriergefäß	Nalgene „Mr. Frosty“	Thermo Scientific
Inverses Mikroskop	CK2	Olympus
Kolbenhubpipetten, div. Volumina	RAININ LTS Classic	Mettler-Toledo
Kühlzentrifuge	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved	BRAND
Sicherheitswerkbank (Klasse II)	SterilGARD	The Baker Company
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences
Wasserbad mit Temperaturkontrolle	M20	LAUDA

2.2.2. Medien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
DMEM mit stabilem Glutamin	Biochrom	FG 0415
PBS (nach Dulbecco), ohne Ca und Mg	PAA	H15-002
EMEM mit stabilem Glutamin	Biochrom	FG 0325
Fötales Kälberserum, standardisiert	Biochrom	S 0615
Natriumpyruvat, 100 mM	Biochrom	L 0473
Nicht-essentielle Aminosäuren, 100x Konzentrat	Biochrom	K 0293
Penicillin/Streptomycin, 100x Konzentrat	Biochrom	A 2213

2.2.3. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
5-Objektträger-Boxen	Sigma-Aldrich	HS 15 986
6-Well-Platten	BD Falcon	353 046
Kryoröhrchen, 2mL	Greiner Bio-One	122 277
Pipettenspitzen, 20 µL	Mettler-Toledo	RT-L10F
Pipettenspitzen, 200 µL	Mettler-Toledo	RT-L200F
Pipettenspitzen, 300 µL	Mettler-Toledo	RT-L300F
Pipettenspitzen, 1 mL	Mettler-Toledo	RT-L1000F
Quadripermschalen	Greiner Bio-One	96 077 307
Röhrchen, 15 mL	BD Falcon	352 096
Röhrchen, 50 mL	BD Falcon	352 098
Serologische Pipetten, 2 mL	BD Falcon	357 507
Serologische Pipetten, 5 mL	BD Falcon	357 543
Serologische Pipetten, 10 mL	BD Falcon	357 551
Serologische Pipetten, 25 mL	BD Falcon	357 525
T25 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	690 175
T75 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	658 175
T175 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	660 175

2.2.4. Zellen

Alle Hauptversuche wurden mit der Glioblastom-Zelllinie U87 (ATCC, Art.-Nr.: HTB-14) durchgeführt. Die Zellen stammen aus einem Grad IV Astrozytom einer 44-jährigen Frau [173]. Die Zelllinie zählt zu den am häufigsten untersuchten Gehirntumorzellen und hat besonders große Bedeutung für klinische Studien in Tiermodellen. Der p53-Status der Zellen ist normal. Das U87-Genom wurde 2010 vollständig sequenziert [174]. In vitro wachsen die Zellen adhärent mit epithelialer Morphologie und stellen bei Konfluenz das Wachstum ein.

Für einige Vorversuche zur Methodenoptimierung wurden neben U87 auch MRC-5 Zellen (ATCC, Art.-Nr.: CCL-171) verwendet. Es handelt sich dabei um primäre Fibroblasten aus physiologisch normalem Lungengewebe eines 14-wöchigen, männlichen Fötus [175]. Die Morphologie der Zellen ist epithelial. Sie wachsen adhärent und zeigen bei Konfluenz Kontaktinhibition.

2.2.5. Kultivierung von U87 Zellen

U87 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% standardisiertem fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Kryokonservierte U87 Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt. Sobald ~90% der Suspension aufgetaut war, wurden die Zellen in eine T75-Flasche mit 15 mL vorgewärmtem Medium überführt und über Nacht (ÜN) im Brutschrank bei 37°C in einer dampfgesättigten Atmosphäre mit 6% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch 15 mL frisches Medium ersetzt, um das Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Einfriermedium zu entfernen.

Routinemäßig wurden die Zellen alle 3 Tage nach der Aussaat im Verhältnis 1:5 passagiert, wobei beim Wechsel der Flaschengröße der geänderten Wachstumsfläche Rechnung getragen wurde. Dieser Rhythmus garantierte das gleichmäßige Wachstum der Kultur, ohne Überschreiten von 60–80% Konfluenz. Alle erforderlichen Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, um Zellstress durch Temperaturgradienten zu vermeiden (die Zellen reagieren empfindlich auf Hitzeschocks und können sich vom Flaschenboden lösen, wenn man sie in kaltem Medium in den Brutschrank stellt). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gespült, 10–20 s mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Restliche adhärenente Zellen wurden durch leichtes Abklopfen der Flaschen gelöst und das Trypsin wurde durch Zugabe des 4-fachen Volumens an frischem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in frische Kulturflaschen verteilt, mit Medium auf das Zielvolumen aufgefüllt (5/15/25 mL bei T25-/T75-/T175-Flaschen) und im Brutschrank inkubiert.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde eine U87 Zellbank in Form von Kryokonserven erstellt, die als Grundlage für alle Experimente dienen. Hierzu wurden $76 \cdot 10^6$ Zellen aus 8 T175-Flaschen geerntet, in 50 mL Einfriermedium (Vollmedium mit 10% DMSO) aufgenommen und in 1 mL Portionen zu je $\sim 1,5 \cdot 10^6$ Zellen auf 43 Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden bei einer Abkühlgeschwindigkeit von $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ÜN in einem Kryogefäß auf -80°C gekühlt, in eine Kunststoffbox überführt und in der Dampfphase eines elektronisch geregelten Flüssig-Stickstoff-Tanks bei ca. -175°C gelagert. Während der Zellkultur wurden regelmäßig Kontaminationskontrollen (Multiplex-PCR) durch eine DKFZ-interne Dienstleistungseinheit durchgeführt [176].

2.2.6. Wachstumskurve U87

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der U87 Zellen unter den verwendeten Kulturbedingungen, wurden je $5 \cdot 10^5$ Zellen in T75-Flaschen ausgesät und die Zellzahl wurde täglich durch Auszählen mit der Neubauerkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Abbildung 2.1 zeigt die Ergebnisse. Nach einer anfänglichen Lag-Phase wuchs die Zellzahl exponentiell (Log-Phase) mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von $0,0219 \text{ h}^{-1}$, bzw. einer Verdopplungszeit von 32 h. Ab einer Zellzahl von etwa $9 \cdot 10^6$ trat Kontaktinhibition ein und die Zellen gingen in die stationäre Phase über. Die Konfluenz wurde bei $\sim 10 \cdot 10^6$ Zellen

erreicht. Zur Vermeidung von Kontaktinhibition wurden die Zellen bei maximal 80% der Konfluenz passagiert. Dies entsprach einer Zellzahl von $2,7 \cdot 10^6$ in T25-Flaschen, $8,0 \cdot 10^6$ in T75-Flaschen und $18,7 \cdot 10^6$ in T175-Flaschen.

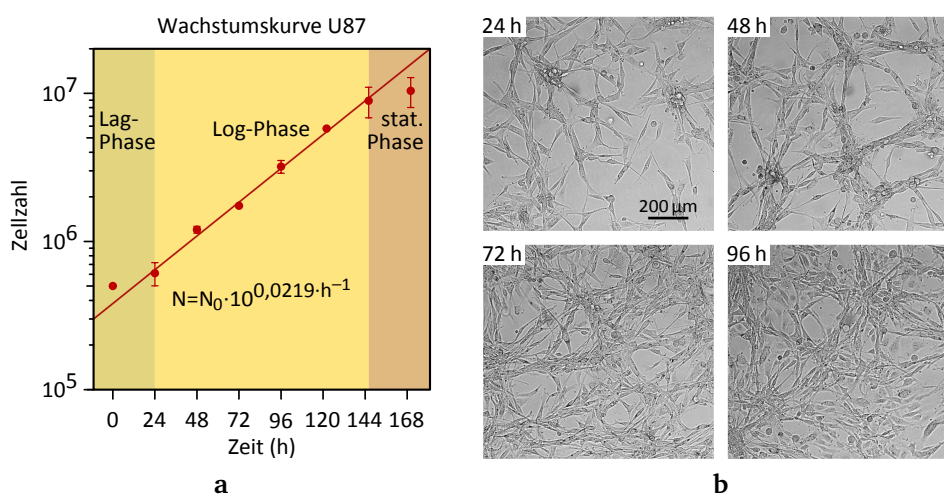


Abbildung 2.1. | Wachstum von U87 Zellen. (a) Wachstumskurve (Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahl und exponentieller Fit der Log-Phase). (b) Phasenkontrastbilder der Zellen im Zeitverlauf.

2.2.7. Kultivierung von MRC-5 Zellen

MRC-5 Zellen wurden in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 1x Nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert (alle Angaben sind Endkonzentrationen). Abweichend von der Vorgehensweise bei U87 wurden kryokonservierte MRC-5 Zellen nach dem Auftauen nicht direkt ausgesät, sondern zunächst in 10 mL Medium aufgenommen und 5 min bei 125xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, um die Zellen von dem Einfriermedium zu befreien. Das Zellpellet wurde in 15 mL frischem Medium resuspendiert und in eine T75-Flasche überführt, die anschließend unter den gleichen Bedingungen im Brutschrank inkubiert wurde, wie bei U87. Die Subkultur erfolgte analog zur Prozedur bei U87, ebenfalls alle 3 Tage und im Verhältnis 1:5.

2.3. Bestrahlung

Für Bestrahlungsexperimente kamen je nach Zielsetzung verschiedene Strahlenquellen und experimentelle Anordnungen zum Einsatz. Für die Durchflusszytometrie wurden Zellen in T25-Flaschen bestrahlt, für Proteinanalysen (Western Blot) wurden T75-Flaschen benutzt und für rein mikroskopische Untersuchungen wurden Zellen auf Objektträgern (OT) oder Deckgläsern (DG) verwendet.

Experimente mit Photonenstrahlung wurden am DKFZ durchgeführt. Für die Hauptversuche kam ein Linearbeschleuniger (LinAc) ARTISTE (Siemens) zum Einsatz, mit dem auch Patienten behandelt werden. Vorversuche zur Methodenentwicklung wurden mit einer ^{60}Co γ -Strahlenquelle (Gammatron, Siemens) durchgeführt. Bestrahlungen mit ^{12}C -Ionen erfolgten hauptsächlich am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT) der Uniklinik.

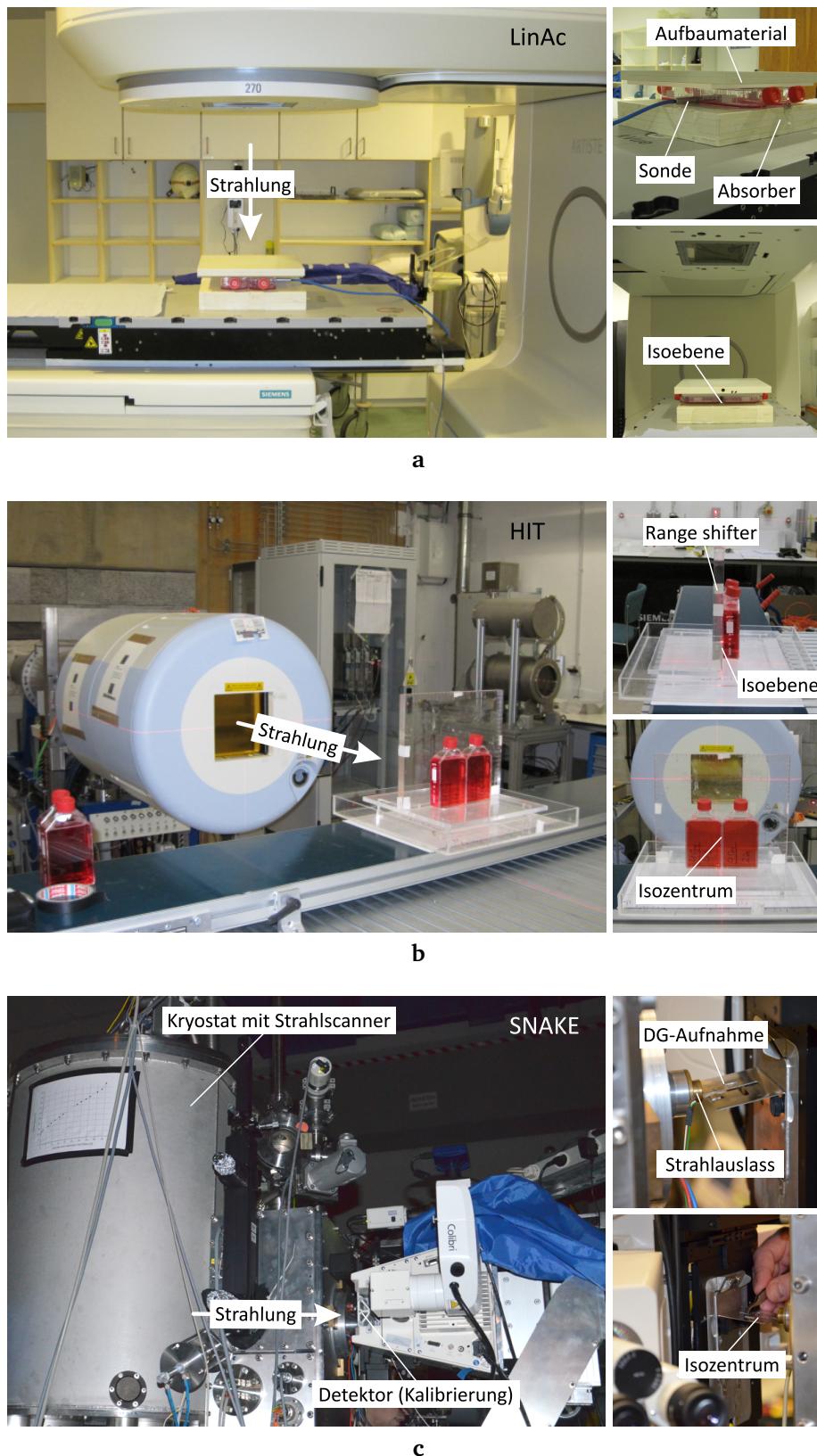


Abbildung 2.2. | Bestrahlungsanordnungen. (a) LinAc: Bestrahlung von oben, durch 30 mm wasseräquivalentes Aufbaumaterial über der Isoebene (Zellebene). Vorversuche wurden auf ähnliche Weise am Gammatron durchgeführt, jedoch ohne Aufbaumaterial (nicht abgebildet). (b) HIT: Bestrahlung von der Seite, durch 30 mm wasseräquivalentes Material (Range shifter) vor der Isoebene (Zellebene). (c) SNAKE: Schrägbestrahlung, Zellebene $\sim 7^\circ$ gegenüber der Strahlrichtung verkippt.

Tabelle 2.1. | Kenngrößen der eingesetzten Strahlenquellen. Der lineare Energietransfer (LET) bezieht sich auf die wasseräquivalente Absorption in der Zellebene gemäß den Versuchsanordnungen in Abb. 2.2. Er entspricht bei HIT-Bestrahlung dem Mittelwert der im spread-out Bragg-Peak (SOBP) überlagerten Teilchen mit unterschiedlichen Energien und bei SNAKE-Bestrahlung dem Wert im monoenergetischen Bragg-Peak.

	Strahlenart	Strahlführung	LET keV· μm^{-1}
Gammatron	Photonen, 1,25 MeV	homogenes Bestrahlungsfeld	~0,3
LinAc	Photonen, 6 MeV	homogenes Bestrahlungsfeld	~0,3
HIT	beschleunigte $^{12}\text{C}^{6+}$ -Ionen, 1,2 – 2,4 GeV (100 – 200 MeV· u^{-1})	Rasterscan-Verfahren, 8 mm SOBP	~120
SNAKE	beschleunigte $^{12}\text{C}^{6+}$ -Ionen, 35 MeV (2,92 MeV· u^{-1})	Rasterscan-Verfahren, monoenergetisch	~450

Einige Experimente mit ^{12}C -Ionen-Strahlung wurden außerdem an der experimentellen Ionenstrahl-Anlage SNAKE (Supraleitendes Nanoskop für Angewandte Kernphysikalische Experimente) der Technischen Universität München durchgeführt. Abbildung 2.2 zeigt den jeweils verwendeten experimentellen Aufbau und in Tabelle 2.1 sind die physikalischen Kenngrößen der unterschiedlichen Strahlenquellen gegenübergestellt.

Für alle Experimente, die dem direkten Vergleich der Wirkung von Photonen- und ^{12}C -Ionen-Strahlung dienen, wurden die Bestrahlungen am LinAc, bzw. am HIT durchgeführt. Aufgrund der horizontalen Strahlführung am HIT mussten die Behälter mit den Zellen aufrecht gestellt werden. Je nach applizierter Dosis und Feldgröße dauerte eine Bestrahlung bis zu 15 min; um zu verhindern, dass die Zellen austrockneten wurden die Behälter vor der Bestrahlung mit vorgewärmtem Medium (inklusive 10% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin) aufgefüllt. Nach der Bestrahlung wurde das überschüssige Medium wieder entfernt. Zellen auf OT wurden dazu in den ersten Steckplatz steriler 5-Objekträger-Boxen gestellt. Die Zellseite zeigte in Richtung der unbesetzten Steckplätze und in Richtung der Strahlenquelle. Die Dicke des Range shifters wurde so angepasst, dass sich mit dem zusätzlich durchstrahlten Medium wieder eine wasseräquivalente Durchstrahlungstiefe von 30 mm vor der Isoebene ergab, die mit der Zellebene zur Deckung gebracht wurde.

Am LinAc konnten die Zellen im Liegen bestrahlt werden, so dass es nicht erforderlich war die Behälter mit Medium aufzufüllen. Nach der Bestrahlung wurde analog zum Vorgehen am HIT dennoch das Medium ausgetauscht, um Sekundärschäden der Zellen durch Aktivierung des Mediums zu vermeiden. Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen γH2AX -Messung (DSB-Marker) konnte gezeigt werden, dass die gegenüber der HIT-Bestrahlung unterschiedliche Anordnung im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Einfluss auf das Messergebnis hatte (siehe Abb. 2.3).

2.3.1. Dosimetrie

Alle im Rahmen der Experimente angegebenen Strahlendosen sind in Gy angegeben und beziehen sich auf die Energiemenge, die in 1 kg reinem Wasser absorbiert wird (wasseräquivalente Dosis).

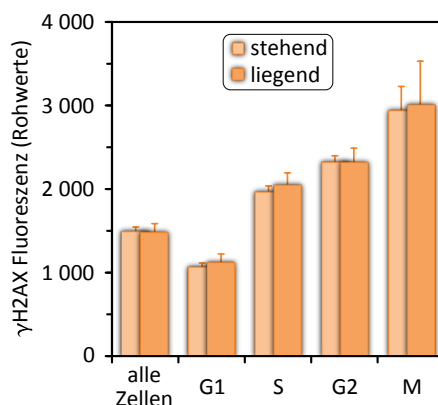


Abbildung 2.3. | Einfluss der Bestrahlungsanordnung. Vergleich des γ H2AX-Signals in U87 Zellen 2 h nach Bestrahlung mit 1 Gy Photonen am LinAc in „liegender“ (gemäß Abb. 2.2a) oder „stehender“ (gemäß Abb. 2.2b) Anordnung (FACS-Messung). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Replikaten. Die Versuchsanordnung hatte keinen Einfluss auf das Messergebnis.

Am Gammatron wurde die applizierte Dosis durch die Expositionsdauer festgelegt. Die monatlich gültige Energiedosisleistung ($\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) lag für eine gegebene Expositionsgeometrie und verschiedene Abstände von der Quelle tabelliert vor. Sie wurde experimentell bestimmt und hängt nach Gleichung (2.2) linear mit der Aktivität der Quelle zusammen. Aus der bekannten Zerfallsrate der Quelle konnte ihre Aktivität gemäß Gleichung (2.1) bestimmt werden, so dass sich die Energiedosisleistung vorausberechnen ließ.

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad \begin{array}{l} A(t) \text{ Aktivität zum Zeitpunkt } t \\ A_0 \text{ Anfangsaktivität} \\ \lambda \text{ Zerfallskonstante} \end{array} \quad (2.1)$$

$$\dot{D} = \Gamma \cdot \frac{A}{r^2} \quad \begin{array}{l} \dot{D} \text{ Energiedosisleistung} \\ \Gamma \text{ Dosisleistungskonstante} \\ A \text{ Aktivität} \\ r \text{ Abstand vom punktförmigen Strahler} \end{array} \quad (2.2)$$

Am LinAc wurde die applizierte Dosis mit Hilfe einer Messsonde kalibriert, die auf dem Prinzip der Ionisationskammer beruhte. Die Sonde wurde dazu zwischen die Behälter mit den zu bestrahlenden Zellen gelegt. Zur Kontrolle wurde die Dosis, die tatsächlich unmittelbar an der Zellebene ankam, mit Hilfe von Thermolumineszenz-Chips [177] überprüft. Dazu wurden 5 T25-Flaschen oder 5 T75-Flaschen mit je einem Chip unter den selben Versuchsbedingungen bestrahlt, die auch bei den Zellbestrahlungen herrschten (inklusive der entsprechenden Menge Medium in den Flaschen). Die Chips waren bei 1 Gy mit 1% Genauigkeit am Gammatron kalibriert worden. Ihre Auswertung ergab für eine Solldosis von 1 Gy am LinAc die Messwerte $1,00 \pm 0,01$ Gy für die T25-Flaschen und $0,99 \pm 0,01$ Gy für die T75-Flaschen.

Am HIT wurde zur gleichmäßigen Dosisapplikation die zu bestrahlende Fläche in der Isoebene (wo sich die Zellen befanden) in ein Raster eingeteilt. Jeder Rasterpunkt wurde in mehreren Durchgängen mit dem Ionenstrahl abgescannt, wobei unterschiedliche nominelle Ionenenergien eingesetzt wurden. In der Summe ergab sich daraus ein 8 mm

breiter spread-out Bragg-Peak, dessen Zentrum in der Isoebene und eine nahezu homogene Fluenz durch die gesamte bestrahlte Fläche. Die entsprechend komplexen Strahlpläne für diverse Dosen lagen bereits für die verwendeten Versuchsanordnungen vor.

Am SNAKE war bei der verwendeten Versuchsanordnung keine genaue Dosimetrie möglich. Die Zellebene lag im Bragg-Peak der monoenergetischen Ionen; deren Energie betrug jedoch nur $2,92 \text{ MeV} \cdot \text{u}^{-1}$, so dass bereits dünne Flüssigkeitsfilme über den Zellen zu einer Verschiebung des Bragg-Peaks, bis zur vollständigen Abschirmung von den Ionen führen konnte. Bei der Bestrahlung musste daher anhängendes Medium durch Aufsetzen der DG-Kante auf Saugpapier minimiert werden, ohne die Zellen austrocknen zu lassen. Für die Bestrahlung wurde ebenfalls ein Rasterscan-Verfahren benutzt, allerdings in kleinerem Maßstab: die Bestrahlungsfläche betrug insgesamt $2 \times 7 \text{ mm}$.

2.4. Proteinanalyse

2.4.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell XCell SureLock Mini Cell	Bio-Rad Invitrogen
Filmentwicklungsmaschine	CURIX 60	Agfa HealthCare
Netzgerät (Elektrophorese/Blotter)	EPS 301	Amersham Pharmacia
Rotationsmixer	Reax 2	Heidolph
Röntgenfilmkassette	für 18x24 cm Filme	Dr. Goos-Suprema
Scanner	Scanjet 5470c	Hewlett-Packard
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot SD	Bio-Rad
Thermomixer für 1,5 – 2,0 mL Röhrchen	Thermomixer compact	Eppendorf
UV/Vis Spectrophotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech

2.4.2. Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
Antikörperset „Double Strand Breaks Repair“	Cell Signaling Technology	9653S
Antikörperset „Autophagy“	Cell Signaling Technology	4445S
Antikörperset „Cell Cycle Regulation II“	Cell Signaling Technology	9870S
Blot-Membran aus Nitrocellulose, $0,45 \mu\text{m}$ Porengröße (Amersham Hybond-ECL)	GE Healthcare	RPN 303 D
Blot-Membran aus PVDF, $0,45 \mu\text{m}$ Porengröße (Immobilon-P)	Millipore	IPV H00 010
Blotpapier, extra dick	Bio-Rad	1 703 965
Chemilumineszenz-Substrat (LumiGLO)	Cell Signaling Technology	7003S

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
Einwegküvetten aus Polystyrol, 10 mm optische Pfadlänge	BRAND	759 015
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Agfa HealthCare	G153
Fixierlösung für Röntgenfilme	Agfa HealthCare	G354
Faltenfilter aus Cellulose, 65 g/m ²	neoLab Migge	11 417
HRP-gekoppelter Sekundärantikörper, Esel-Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cell Signaling Technology	7074S
NuPAGE Antioxidans	Invitrogen	NP0005
NuPAGE Transferpuffer	Invitrogen	NP0006
NuPAGE Tris-Acetat SDS Laufpuffer	Invitrogen	LA0041
Röntgenfilme, 18x24 cm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare	28 906 837
Polyacrylamidgele 4 – 20%, Tris-Glycin (Pierce Precise, 15 Taschen)	Thermo Scientific	25 274
Polyacrylamidgele 12%, Tris-Glycin (Mini-PROTEAN TGX, 10 Taschen)	Bio-Rad	456-1043S
Polyacrylamidgele 3 – 8%, Tris-Acetat (NuPAGE Novex, 15 Taschen)	Invitrogen	EA 03 755 BOX
Protease Inhibitor Tabletten (cOmplete, Mini)	Roche Applied Sciences	04 693 124 001
Proteintest nach Bradford	Bio-Rad	500-0006
Proteinextraktions-Kit (Qproteome Mammalian Protein Prep Kit)	Qiagen	37 901
Proteinleiter zur Markierung des Molekulargewichts (Pierce PageRuler Plus Prestained)	Thermo Scientific	26 619
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich	P 5726
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich	P 0044
pRAD52-AK: Anti-RAD52 (Phospho-Tyr104), polyklonal (Kaninchen)	Assay Biotechnology	A1119

2.4.3. Lösungen

Lösung	Herstellung
AK-Puffer WB	50 mg·mL ⁻¹ BSA, 0,1% Tween-20 in 1x TBS. Tween-20 zum Schluss unter Rühren zugegeben (schäumt stark).
Blockpuffer	50 mg·mL ⁻¹ Magermilchpulver, 0,1% Tween 20 in 1x TBS. Tween 20 zum Schluss unter Rühren zugegeben (schäumt stark).
Ladepuffer (3x)	187,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 60 mg·mL ⁻¹ SDS, 30% Glycerin, 0,3 mg·mL ⁻¹ Bromphenolblau, 15% β-Mercaptoethanol. Aliquots ohne β-Mercaptoethanol bei –20°C lagern, β-Mercaptoethanol direkt vor Verwendung ergänzen.
Laemmli Stammlösung (10x)	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, Lagerung bei 4°C.
Laemmli Laufpuffer (pH 8,3)	10% Laemmli Stammlösung, 1 g·L ⁻¹ SDS.

Lösung	Herstellung
Laemmli Transferpuffer (pH 8,5)	10% Laemmli Stammlösung, 20% Methanol.
Lysepuffer	Grundlage: Qproteome Mammalian Protein Prep Kit (Qia-gen). Folgende Verdünnungen in Mammalian Cell Lysis Buffer: 1:100 Protease Inhibitoren aus dem Kit, 1 U·mL ⁻¹ Benzona-se Nuklease aus dem Kit, 1:100 Phosphatase Inhibitor Cock-tail 2 (Sigma-Aldrich), 1:100 Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (Sigma-Aldrich), 1 cOmplete, Mini Protease Inhibitor Tablette (Roche Applied Sciences) pro 10 mL Lysepuffer (Stammlösung zur Herstellung abweichender Mengen: 1 Tablette in 10 mL Mammalian Cell Lysis Buffer).
Ponceau S Färbelösung	1 g·L ⁻¹ Ponceau S, 5% Essigsäure.
10x TBS	200 mM Tris, 1.37 M NaCl, pH mit HCl auf 7,6 einstellen.
TBS-T Waschpuffer	0,1% Tween-20 in 1x TBS.

2.4.4. Proteinaufreinigung

Für Proteinanalysen wurden U87 Zellen in T75-Flaschen zu definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet. Dazu wurde das Medium aus den Flaschen abgegossen und Reste wur-den mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Absaugpumpe entfernt. Der Zellrasen wurde 2x behutsam mit 5 mL PBS gewaschen und nach Absaugen der PBS-Reste mit 300 µL Lysepuf-fer 10 min lang bei RT inkubiert. Von dem Lysepuffer wurden für jedes Experiment 1 – 2 mL mehr hergestellt, als für die Zellernte erforderlich war, da er auch bei der Proteinbestimmung nach Bradford benötigt wurde (siehe Abschnitt 2.4.5). Die Zellen lösten sich bei Kontakt mit dem Lysepuffer sofort vom Flaschenboden und wurden, unterstützt durch den Einsatz von Zellschabern, in einer Ecke der Flasche gesammelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Ly-sate in 2 mL Röhrchen überführt, kurz gevortext und dann 10 min bei 4°C und ~14 000xg (12 000 U·min⁻¹) zentrifugiert, um Zelltrümmer und DNA zu sedimentieren. Die Proteinfrak-tion im Überstand wurde in frische 1,5 mL Röhrchen pipettiert und bei -20°C eingefroren.

2.4.5. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden mit einem Proteintest bestimmt, der auf der kolorimetri-schen Messung nach Bradford [178] beruht (Bio-Rad). Das Färbereagenz wurde 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt und durch einen Faltenfilter aus Cellulose gegeben. Für die Messung wurden Aliquots der zu bestimmenden Proben in der Regel 1:4 verdünnt, und es wurden Konzentrationsstandards mit 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 und 1,0 mg·mL⁻¹ bo-vinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Die Standards enthielten außerdem den Lysepuffer, der zur Proteinaufreinigung verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.4.4) in derselben Verdün-nung wie die Aliquots der Proben. Von den Proben und Standards wurden 20 µL mit 1 mL des verdünnten Farbstoffkonzentrats gemischt und in Einwegküvetten mit einer optischen Pfadlänge von 10 mm überführt.

Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge gemessen, wobei die Standardlösung ohne BSA zur Nullpunktkorrektur genutzt wurde. Aus den Ex-tinktionswerten und bekannten Konzentrationen der Standards wurde mit Microsoft Excel eine Eichgerade berechnet, mit der sich anschließend die Gesamtprotein-Konzentrationen der Proben berechnen ließen. Zur Gewährleistung zuverlässiger Ergebnisse wurde darauf

geachtet, dass das Bestimmtheitsmaß der Eichgeraden mindestens 0,98 betrug und alle Bestimmungen innerhalb des Messbereichs der Eichgeraden lagen. War das nicht der Fall, so wurde die Bestimmung wiederholt, ggf. mit geänderter Probenverdünnung.

Die bestimmten Gesamtprotein-Konzentrationen dienten als Ausgangspunkt für den Einsatz gleich großer Proteinmengen in nachfolgenden Western Blot Analysen (5 µg). Die entsprechenden Volumina wurden ggf. leicht korrigiert, indem zunächst β-Actin als interne Kontrolle mit der Western Blot Methode nachgewiesen wurde. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mit Hilfe der Bildanalysesoftware ImageJ ausgewertet. Dazu wurden die Aufnahmen invertiert, so dass die β-Actin-Banden hell erschienen. Der mittlere Hintergrund des Films wurde in einem Bereich ohne Banden gemessen und im gesamten Bild korrigiert. Anschließend wurde die Gesamtintensität jeder Bande gemessen und mit der ersten Bande ins Verhältnis gesetzt, bei der es sich immer um eine unbestrahlte Kontrolle handelte. Die so erhaltenen Faktoren wurden mit dem eingesetzten Probenvolumen multipliziert, wodurch sich die korrigierten Werte ergaben. Zur Absicherung wurde die β-Actin-Bestimmung mit den korrigierten Werten wiederholt.

2.4.6. SDS-PAGE

Proteinextrakte wurden zur Vorbereitung von Western Blot Analysen mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dazu wurden standardmäßig vorgegossene Gele mit einem Acrylamid-Gradienten von 4–20% (Pierce Precise, Thermo Scientific) und ein Puffersystem nach Laemmli [179] verwendet. Für einige kleine Proteine (<60 kDa) kamen 12% Acrylamidgele (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad) zum Einsatz (gleiches Puffersystem), für besonders große Proteine wurden 3–8% Tris-Acetat-Gele (NuPAGE Novex, Invitrogen) mit zugehörigem Tris-Acetat-Puffer benutzt. Gemäß Abschnitt 2.4.5 wurden 5 µg Gesamtprotein je Probe mit 5 µL 3x Ladepuffer inklusive β-Mercaptoethanol (siehe 2.4.3) versetzt, mit deionisiertem Wasser auf 15 µL aufgefüllt und durch Auf- und Ab-Pipettieren gemischt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 5 min lang bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt, der Laufpuffer wurde eingefüllt und die Geltaschen wurden mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle mit dem Puffer gespült, um Gelrückstände und Luftblasen zu entfernen. Die Geltaschen wurden mit den Proben beladen. Zur Größenmarkierung wurden außerdem 5 µL einer Proteinleiter aufgetragen. Alle Western Blot Experimente zum direkten Vergleich von Photonen- und ¹²C-Ionen-Bestrahlung wurden paarweise durchgeführt. Die Elektrophorese lief 1 h bei 90 V.

2.4.7. Western Blot

Nach der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.4.6) wurde die Plastikeinfassung der Gele entfernt und die Geltaschen wurden mit Hilfe einer Rasiermesser Klinge abgetrennt. Eine Blot-Membran aus Nitrocellulose (Amersham Hybond-ECL) wurde mit ein wenig Überstand auf die Gelmaße zugeschnitten. Gele, Membranen und extra dickes Blotpapier wurden 15 min in Laemmli Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Blot-Anordnung (Semi-dry-Verfahren) gemäß Abbildung 2.4 aufgebaut, und eventuell eingeschlossene Luftblasen durch Überrollen der oberen Lage Blotpapier mit einer serologischen Pipette herausgepresst. Der Blot wurde 50 min bei 12 V (maximal 5,5 mA·cm⁻²) durchgeführt.

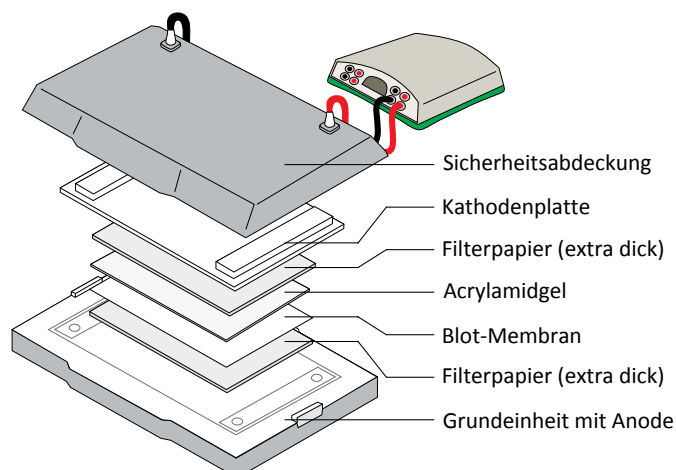


Abbildung 2.4. | Blot-Anordnung. Aufbau für das Semi-dry-Verfahren. Quelle: Bio-Rad (modifiziert).

Für einige große Proteine wurden abweichend PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore) und ein Wet-blot-Verfahren benutzt. Die PVDF-Membranen wurden zur Aktivierung 30 s lang in Methanol, 2 min in deionisiertem Wasser und 5 min in Transferpuffer inkubiert. Der Wet-Blot erfolgte in einer XCell SureLock Elektrophoresekammer mit Blot-Modul (Invitrogen) nach Herstellerangaben 2 h bei 150 V (Tris-Acetat-Gele und -Puffersystem).

Nach dem Blot wurden die Membranen 5 min bei leichter Bewegung auf einem Taumler mit 1x TBS gewaschen. Zur Kontrolle des Proteinübertrags wurden die Membranen kurz mit 25 mL Ponceau S Färbelösung inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser entfärbt. Nach vollständiger Entfärbung wurden die Membranen 1 h lang mit 25 mL Blockpuffer unter langsamer Bewegung auf einem Taumler bei RT inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen. Dieser Schritt entfiel beim Einsatz von PVDF-Membranen. Es folgten 3x 5 min Waschschrte mit TBS-T, während denen AK-Lösung vorbereitet wurde.

Primärantikörper (1°AK) wurden in der Regel 1:1000 in AK-Puffer WB verdünnt. Abweichend davon wurde der β -Actin-Antikörper 1:2000 und der pRAD52-AK 1:500 eingesetzt. Bei allen Antikörpern handelte es sich um Immunglobuline der Kategorie G (IgG) aus Kaninchen, mit Ausnahme des Cyclin A2 Antikörpers aus dem Set „Cell Cycle Regulation II“, der aus der Maus stammte. Die Membranen wurden auf eine Kunststofffolie gelegt und in ein 15 mL Falcon Röhrchen mit 5 mL 1°AK-Lösung eingeführt. Die Röhrchen wurden waagrecht auf einem Rotationsmischer mit entsprechender Haltevorrichtung befestigt und bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Membranen 3x 5 min mit 15 mL TBS-T gewaschen und mit 5 mL HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (2°AK) inkubiert (Ziege-Anti-Kaninchen IgG, bzw. Pferd-Anti-Maus IgG, 1:2000 in AK-Puffer WB). Die Inkubation erfolgte 2 h wie zuvor in Röhrchen auf einem Rotationsmischer.

Die Membranen wurden erneut 3x 5 min mit TBS-T gewaschen und dann 1 min mit 10 mL Chemilumineszenz-Substrat (LumiGLO) pro Membran inkubiert. Danach wurden die Membranen luftblasenfrei in eine Klarsichthülle gelegt und mit Klebeband auf der Innenseite einer Filmkassette fixiert. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme in die Kassette eingelegt und belichtet. Die Belichtungszeit wurde für jedes zu detektierende Protein optimiert und

reichte von wenigen Sekunden bis hin zu 25 min. Die Filme wurden maschinell entwickelt, fixiert, gewaschen und getrocknet. Zur Dokumentation wurden die Filme eingescannt.

2.5. Immunfluoreszenz-Färbungen für Mikroskopie und FACS

2.5.1. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Software: Multiset	BD
Durchflusszytometer	LSR II, Software: FACSDiva	BD
Färbekästen*	Rotilbo-Färbekästen	Carl Roth
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E600, Filter: DAPI/FITC/G-2A	Nikon
Mikroskopkamera	ColorView III, Software: cellF	Olympus
HCS Mikroskop	Axioplan 2 (Zeiss), Software: Metafer, inkl. MetaCyte	MetaSystems
Wärmeschrank	Heraeus UT6120	Thermo Scientific

*Einsätze für 24x24 mm Deckgläser, Spezialanfertigung, DKFZ Mechanikwerkstatt.

2.5.2. Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
Anti-Kaninchen 2°AK (AF594): Ziege-Anti-Kaninchen IgG (H+L), Alexa Fluor 594 konjugiert	Invitrogen	A-11012
Anti-Maus 2°AK (AF488): Ziege-Anti-Maus IgG (H+L), highly cross-absorbed, Alexa Fluor 488 konjugiert	Invitrogen	A-11029
Anti-Maus 2°AK (AF647): F(ab') ₂ -Fragmente Ziege-Anti-Maus IgG (H+L), Alexa Fluor 647 konjugiert	Invitrogen	A-21237
Casp3*-AK: Aktivierte Caspase-3 Antikörper, Klon C92-605 (Kaninchen), Alexa Fluor 647 konjugiert	BD Pharmingen	560 626
Diagnostica-Objektträger, 3 Pipettierfelder (Ø 14 mm)	neoLab Migge	45 179 065
Eindeckmedium Fluoromount-G	Southern Biotech	0100-01
Eindeckmedium Immu-Mount	Thermo Scientific Shandon	99-904-02
γH2AX-AK: Phosphohiston-H2AX (Ser139) Antikörper, Klon 2F3 (Maus), Alexa Fluor 488 konjugiert	BioLegend	613 406
Glucose-Oxidase, lyophilisiert, ~200 U·mg ⁻¹	Sigma-Aldrich	49 108
Katalase, ≥ 0,5·10 ⁶ U·mg ⁻¹	Sigma-Aldrich	02 071
MG132, 10 mM in DMSO	Merck	474 790

Bezeichnung	Bezugsquelle	Art.-Nr.
pBRCA1-AK: Phospho-BRCA1 (Ser1524) Antikörper, polyklonal (Kaninchen)	Cell Signaling Technology	9009S
pH3-AK: Phosphohiston-H3 (Ser10) Antikörper, Klon D2C8 (Kaninchen), Alexa Fluor 555 konjugiert	Cell Signaling Technology	3475S
RNase A, lyophilisiert, 70 U·mg ⁻¹	Sigma-Aldrich	R-5503
Röhrchen mit Zellsieb für die Durchflusszytometrie	BD Falcon	352 235
SuperKillerTRAIL	Enzo Life Science	ALX-201-115

2.5.3. Lösungen

Lösung	Herstellung
AK-Puffer IF	30 mg·mL ⁻¹ BSA in PBS.
DAPI-Färbelösung F	1 µg · ml ⁻¹ DAPI in PBS.
DAPI-Färbelösung M	1 µg · ml ⁻¹ DAPI.
Fixierlösung F	45 mg·mL ⁻¹ PFA in PBS. Herstellung und Verwendung unter dem Abzug (giftige Stäube/Dämpfe). PFA unter langsamem Rühren bei 85°C in PBS lösen (Becherglas mit Alufolie isolieren). Auf RT abkühlen lassen, Endvolumen mit PBS einstellen und Lösung durch einen Cellulosefilter geben.
Fixierlösung M	30 mg·mL ⁻¹ PFA, 20 mg·mL ⁻¹ Saccharose in PBS. Herstellung und Verwendung unter dem Abzug (giftige Stäube/Dämpfe). PFA und Saccharose unter langsamem Rühren bei 85°C in PBS lösen (Becherglas mit Alufolie isolieren). Auf RT abkühlen lassen, Endvolumen mit PBS einstellen und Lösung durch einen Cellulosefilter geben.
MEA Eindeckmedium	100 mM β-Mercaptoethanolamin (MEA) in PBS, pH 7,4
Permeabilisierungspuffer	20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl ₂ , 300 mM Saccharose, 0,5% Triton-X 100 pH 7,4 (ggf. einstellen mit HCl/NaOH).
PI-Färbelösung	5 µg · ml ⁻¹ PI in PBS.
RNase-Lösung	200 µg · ml ⁻¹ RNase A in Waschpuffer F
Switching Buffer	100mg·mL ⁻¹ D-Glucose, 50 mM MEA, ~650 U·mL ⁻¹ Katalase, ~100 U·mL ⁻¹ Glucose-Oxidase, alles gelöst in PBS (pH 7,4), in der angegebenen Reihenfolge (Enzyme frisch vor Benutzung zugeben, oder fertigen Switching Buffer aliquotieren und bei -20°C lagern).
SB ⁻	10% Switching Buffer in 50 mM MEA/PBS (pH 7,4).
Waschpuffer F	5 g·L ⁻¹ BSA in PBS.
Waschpuffer M	0,1% Tween 20 in PBS.

2.5.4. Mikroskopie

Diagnostica-OT mit Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt nach Bestrahlung in Glasküvetten mit Fixierlösung M 5 min bei RT inkubiert und dann in frische Küvetten mit 4°C kaltem Permeabilisierungspuffer überführt. Alle nachfolgenden Schritte in Küvetten wurden bei langsamer Bewegung auf einem Taumler durchgeführt. Die Proben wurden 15 min mit

Permeabilisierungspuffer inkubiert und anschließend 4x 4 min mit Waschpuffer M gewaschen. Der γ H2AX-Antikörper wurde 1:500 in AK-Puffer IF verdünnt (100 μ L/Probe). Die OT wurden aus der Waschlösung entnommen und die hydrophobe Beschichtung der OT wurde mit Saugpapier trocken gewischt, ohne die Benetzung der Pipettierfelder zu gefährden. Auf 2 Feldern wurden 50 μ L AK-Lösung aufgetragen; auf das dritte Feld kam reiner AK-Puffer IF (Leerkontrolle). Ab diesem Schritt wurden die Proben stets im Dunkeln gehalten. Zur Gewährleistung der vollständigen und gleichmäßigen Benetzung der Felder, wurden Deckgläser auf die OT aufgelegt. Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer ÜN bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser entfernt und die Waschschritte wiederholt. Die OT wurden analog zur Vorgehensweise beim 1°AK mit 2°AK inkubiert, wobei dieser 1:1000 verdünnt wurde und die Inkubation 1 h bei 37°C durchgeführt wurde. Die 4 Waschschritte wurden abermals wiederholt und um einen weiteren 4 min Waschschritt mit deionisiertem Wasser ergänzt. Anschließend wurden die OT 15 s lang in ein 50 mL Röhrchen DAPI-Färbelösung M getaucht, um die Zellkerne zu färben. Überschüssige Lösung wurde durch kurzes Eintauchen in ein Becherglas mit deionisiertem Wasser entfernt. Restliche Flüssigkeit wurde mit Saugpapier abgenommen, ohne die Pipettierfelder zu berühren. Mit einem Glasstab wurde ein linsengroßer Tropfen Fluoromount-G wurde auf jedes Feld aufgetragen und die OT wurden unter Vermeidung von Luftblasen mit 24x50 mm Deckgläsern bedeckt. Die Präparate wurden ÜN bei RT in Pappmappen getrocknet und dann bei 4°C gelagert.

Mit Hilfe einer High content screening (HCS) Mikroskopie-Plattform der Firma MetaSystems wurden je Präparat mindestens 400 – 500 Zellen aufgenommen und ausgewertet. Das System bestand aus einem Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss) mit motorisiertem Objektisch, das von der Software Metafer (Version 4), inklusive dem Analyse-Modul MetaCyte gesteuert wurde (siehe Abb. 2.5). Die Zellen wurden mit einer Mikroskopkamera (CV-M42146, JAI) über ein Luftobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer Numerischen Apertur (NA) von 0,75 detektiert. Das System ermöglichte die Bearbeitung von 8 Präparaten in einem Lauf, wobei mehrere Parameter auf einmal gemessen werden konnten. In ersten Experimenten wurde lediglich die γ H2AX Focianzahl pro Zellkern erhoben; später wurde außerdem die Fluoreszenzintensität im gesamten Zellkern, innerhalb der Foci und ohne Berücksichtigung der Foci (pan-nukleär) gemessen, sowie die Fläche der Foci und des Zellkerns.

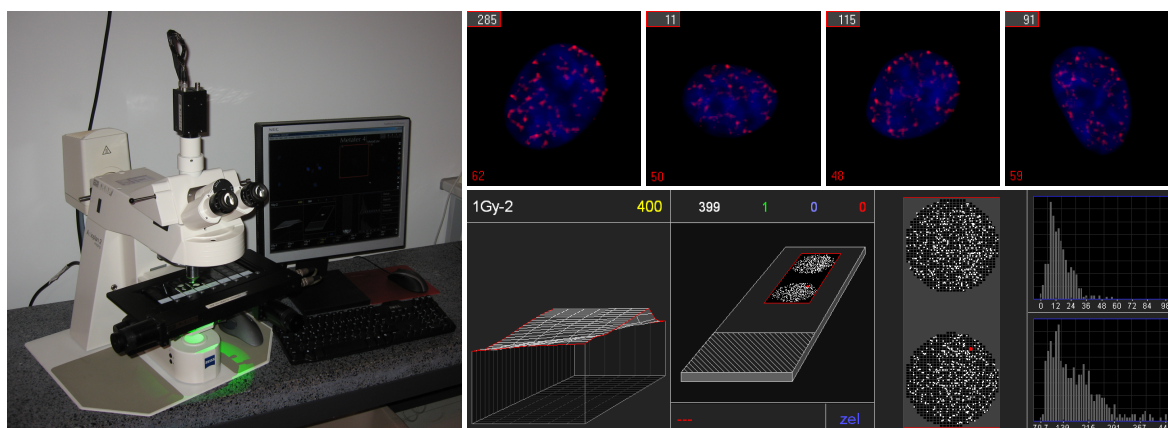


Abbildung 2.5. | HCS Mikroskop (MetaSystems). Das verwendete System bestand aus einem Fluoreszenzmikroskop mit 40x Luftobjektiv, einer Kamera und motorisiertem Objektisch für bis zu 8 Präparate. Die Aufnahmen erfolgten computergesteuert mit der Software Metafer mit MetaCyte Modul.

2.5.5. Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Untersuchungen dienten $1-2 \cdot 10^6$ Zellen in T25 Flaschen als Ausgangsmaterial. Für jede Probe wurden 2 mL Fixierlösung F hergestellt (plus $\sim 10\%$ Überschuss), von denen 1 mL in 15 mL Röhrchen vorgelegt wurde. PBS und Trypsin-EDTA-Lösung wurden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt und bei -20°C gelagertes 70% Ethanol (zur Permeabilisierung) wurde auf Eis gestellt. Mit 3 min Vorlauf vor dem gewünschten Zeitpunkt zur Fixierung der Zellen wurde das Medium aus den Flaschen abgegossen, Reste wurden mit einer Absaugpumpe und einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen wurde mit 1 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und durch 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt. Nach ca. 30 s Inkubation bei RT wurden noch nicht vollständig abgelöste Zellen abgeklopft und durch Überspülen des Bodens mit 1 mL Fixierlösung F gesammelt. Die Suspension wurde durch Auf- und Ab-Pipettieren gemischt, in die vorbereiteten Röhrchen gegeben und durch leichtes Schütteln mit der Vorlage gemischt.

Hierdurch ergab sich analog zum Mikroskopieprotokoll eine Endkonzentration der Fixierlösung von 3% PFA. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert und dann bei 7°C und $200 \times g$ 5 min lang zentrifugiert. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Der Überstand wurde abgegossen und die pelletierten Zellen wurden in 3 mL eiskaltes 70% Ethanol resuspendiert. Die Proben wurden auf Eis gesammelt und bei 4°C gelagert.

Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 3 mL Waschpuffer F resuspendiert. Auf diese Weise wurden 3 Waschschrte durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in $100 \mu\text{L}$ 1:20 verdünntem $\gamma\text{H2AX-AK}$ in AK-Puffer IF resuspendiert, 1 h lang bei RT inkubiert und gelegentlichem aufgeschüttelt. Ab diesem Schritt wurden die Proben stets in Dunkeln gehalten. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abermals pelletiert und nach Abnehmen des Überstands mit einer Kolbenhubpipette in $250 \mu\text{L}$ PBS resuspendiert.

Die Suspensionen wurden durch das Zellsieb im Deckel spezieller Röhrchen für die Durchflusszytometrie (BD Falcon) pipettiert, auf Eis gestellt und kurz vor der Messung noch einmal aufgeschüttelt. Zur Messung wurde für erste Versuche das Durchflusszytometer FACSCalibur (BD) benutzt; später machte die Erweiterung der Färbung den Einsatz des Modells LSR II (BD) erforderlich (siehe Methodenentwicklung).

2.6. Datenerhebung und statistische Auswertung

Alle Hauptversuche wurden mindestens ein- bis zweimal wiederholt, mit Ausnahme der sehr aufwändigen Untersuchungen mit supraauflösender Mikroskopie. Für die Durchflusszytometrie (FACS) und High content screening (HCS) Mikroskopie wurden bei jedem Experiment 3 separate Proben (Replikate) zu jedem Datenpunkt gemessen (3-fach Bestimmung). FACS-Messungen umfassten mindestens $1-2 \cdot 10^4$ Ereignisse innerhalb des Gates *Zellen* (siehe Abschnitt 3.1.5) und für die HCS Mikroskopie wurden von jeder Probe mindestens 500 Zellen aufgenommen (Ausschuss nach Qualitätskontrolle typischerweise $< 10\%$).

In beiden Fällen wurden aus den Messwerten zu jeder erhobenen Messgröße der Median bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, zeigen die Diagramme im Ergebnisteil die arithmetischen Mittelwerte dieser Mediane aus allen zusammengehörenden Replikaten und

Wiederholungen eines Experiments. Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. Auffällige Unterschiede zwischen den so erhaltenen Datenpunkten wurden mit Hilfe von einseitigen t-Tests auf Signifikanz geprüft. Dazu wurden zunächst durch F-Tests geprüft, ob sich die Varianz der Datenpunkte unterschied. War dies der Fall, so wurde ein heteroskedatischer Test (Welch-Test) durchgeführt, ansonsten ein homoskedatischer. Getestet wurde die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen beiden Messreihen) zum Signifikanzniveau von 0,05. An einigen Stellen wurde in den Diagrammen auf hochsignifikante oder nicht signifikante Unterschiede hingewiesen.

3

METHODENENTWICKLUNG

In diesem Abschnitt wird erläutert, wie und warum die angewandten Methoden modifiziert und weiterentwickelt wurden, um zu den Protokollen zu gelangen, mit denen die Hauptversuche im Ergebnisteil dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die erforderlichen Materialien und Lösungen sind in den entsprechenden Tabellen in Kapitel 2 zu finden.

3.1. Durchflusszytometrie

DSB-Induktion, γ H2AX-Expression, der Zellzyklus und die Einleitung von Apoptose sind eng ineinandergreifende Prozesse. Betrachtet man sie getrennt voneinander, so ergibt sich nur ein unvollständiges Bild. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Erhebung multivariater Daten mit einem hohen Durchsatz, und eignet sich deshalb in besonderer Weise für die Untersuchung komplexer Zusammenhänge. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur gleichzeitigen Messung von γ H2AX, dem Zellzyklus und der Apoptose. Insbesondere sollte untersucht werden, ob U87 Zellen als Modell für Glioblastomzellen in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich sensitiv auf ionisierende Strahlung reagieren, und ob sich dabei Unterschiede zwischen der Bestrahlung mit Photonen und ^{12}C -Ionen zeigen.

Auf die Synchronisierung der Zellen zur Untersuchung einer bestimmten Zellzyklusphase wurde explizit verzichtet, da dies einen erheblichen Eingriff in das eng verflochtene Regulationsnetzwerk der genannten Prozesse bedingt, und die zu messenden Parameter potenziell stark beeinflusst. Im Übrigen bot sich mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Möglichkeit zur getrennten Betrachtung aller Zellzyklusphasen, auch ohne Synchronisierung. Zur Umsetzung der geforderten Methode wurde das in Abschnitt 2.5.5 beschriebene Ausgangsprotokoll zur alleinigen γ H2AX-Messung systematisch erweitert. Im Folgenden werden die maßgeblichen Schritte dazu aufgezeigt und anhand von Ergebnissen aus Vorversuchen erläutert. Das endgültige Protokoll findet sich schließlich in Abschnitt 3.1.4.

3.1.1. Berücksichtigung von Zellzyklus und Apoptose

Aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehalts lassen sich die Zellzyklusphasen G1, S und G2/M anhand der Intensität eines fluoreszenten DNA-Farbstoffs voneinander unterscheiden. Außerdem können apoptotische Zellen detektiert werden, die nach Fragmentierung der DNA kleinere Signalintensitäten aufweisen als G1-Zellen; sie bilden eine eigene Verteilung, die vor dem G1-Peak liegt und daher als *subG1-Peak* bezeichnet wird [180].

Um die zellzyklusspezifische γ H2AX-Messung zu realisieren, wurde zunächst versucht, nach der Immunfärbung die DNA mit Propidiumiodid (PI) zu markieren. Die klassischen Protokolle für eine derartige Färbung sehen meist eine alkoholische Fixierung vor, die jedoch bei Immunfärbungen eher unüblich ist. Deshalb wurden verschiedene Fixierungsarten getestet und mit der PFA-Fixierung verglichen, darunter die Fixierung mit 70% Ethanol (vorgekühlt

auf -20°C), ≥ 30 min auf Eis und mit 2% Essigsäure in PBS (angegeben sind die Endkonzentrationen nach Zugabe der Zellsuspension). Hierzu wurden U87 oder MRC-5 Zellen am Gammatron mit Photonen bestrahlt, nach 30 min mit Trypsin-EDTA-Lösung geerntet und in mehrere Röhrchen verteilt, und unterschiedlich fixiert. Da hierzu mehr Zellen erforderlich waren als üblich, wurden statt T25-Flaschen T75-Flaschen benutzt.

Vor der Antikörper-Inkubation wurde ein einstündiger Verdau mit 1 mL RNase-Lösung ($200\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNase A in Waschpuffer F) bei 37°C durchgeführt, um RNA abzubauen (PI interkaliert doppelsträngige RNA-Abschnitte, deshalb verfälscht RNA die Messung des DNA-Gehalts). Bei grundsätzlich gleicher Vorgehensweise wie im Ausgangsprotokoll (siehe Abschnitt 2.5.5) ergab sich daraus die folgende Variante: Ernte der Zellen — Fixierung mit PFA, Ethanol oder Essigsäure — Permeabilisierung mit 70% Ethanol (kein Extraschritt bei Ethanolfixierung) — 3 Waschschrte mit Waschpuffer F ($5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA in PBS) — RNase-Verdau — Antikörper-Inkubation — Resuspendierung der Zellen in PI-Färbelösung ($5\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PI in PBS) — Filtrieren (Zellsieb) und Messen der Zellen. Zur genaueren Begutachtung der Färbung wurden außerdem $20\ \mu\text{L}$ der Proben auf OT pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Die Art der Fixierung beeinflusste das Messergebnis erheblich: Ethanolfixierung und Essigsäurefixierung führten zu einer vergleichbar guten Trennung der Zellzyklusphasen, während PFA-Fixierung breitere G1- und G2/M-Verteilungen verursachte und damit die zuverlässige Bestimmung der S-Phase erschwerte (siehe Abb. 3.1). Beim γH2AX -Signal zeigte sich eine lineare Dosiskorrelation bei PFA- und Essigsäurefixierung mit guter Übereinstimmung der Absolutwerte; Ethanolfixierung verhinderte hingegen offenbar die Antikörperbindung, da hier keine Veränderung der Signalintensität zu beobachten war (siehe Abb. 3.2). Die mikroskopische Betrachtung der Zellen bestätigte dies, jedoch lag das Signal nach Essigsäurefixierung diffus im Zellkern verteilt vor, und nur bei PFA-Fixierung waren wie erwartet γH2AX Foci erkennbar.

Für rein durchflusszytometrische Untersuchungen stellte sich somit die Essigsäurefixierung als geeignete Wahl heraus, stand aber der Absicht im Wege die Proben mit nur einer Färbung parallel mikroskopisch auszuwerten. Außerdem war es fraglich, ob diese Art der Fixierung die Erweiterung der Färbung mit zusätzlichen Antikörpern zulassen würde. Aus diesen Gründen wurde nach alternativen DNA-Farbstoffen gesucht, die auch bei PFA-Fixierung eine gute Trennung der Zellzyklusphasen erlauben. Mit Hinblick auf die Kombination mit der Mikroskopie wurde die Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) getestet.

Bei gleichem Vorgehen wie für die PI-Färbung nach PFA-Fixierung, wurden die Zellen dazu nach der Antikörper-Inkubation in DAPI-Färbelösung F ($1\ \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAPI in PBS) resuspendiert. Der RNase-Verdau ist bei dieser Färbung nicht unbedingt erforderlich, weil DAPI eine wesentlich höhere Spezifität für DNA aufweist, wurde jedoch trotzdem beibehalten. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer LSR II, da das FACSCalibur nicht über den erforderlichen UV-Laser zur Anregung von DAPI verfügte. Darüber hinaus bot das LSR II die notwendige Flexibilität für zusätzliche Erweiterungen der Färbung

Diese Variante wurde weiter verfolgt, denn sie erwies sich in zweierlei Hinsicht als besonders geeignet: Zum Ersten ermöglichte sie die beste Trennschärfe aller getesteten Alternativen zur Zellzyklusanalyse (siehe Abb. 3.1c). Zum Zweiten behinderte DAPI im Unterschied zu PI nicht die Erweiterung der Färbung mit orange- und rot-fluoreszierenden Farbstoffen, da das Emissionsspektrum im blauen Bereich liegt. Die Anregung mit einem separaten UV-

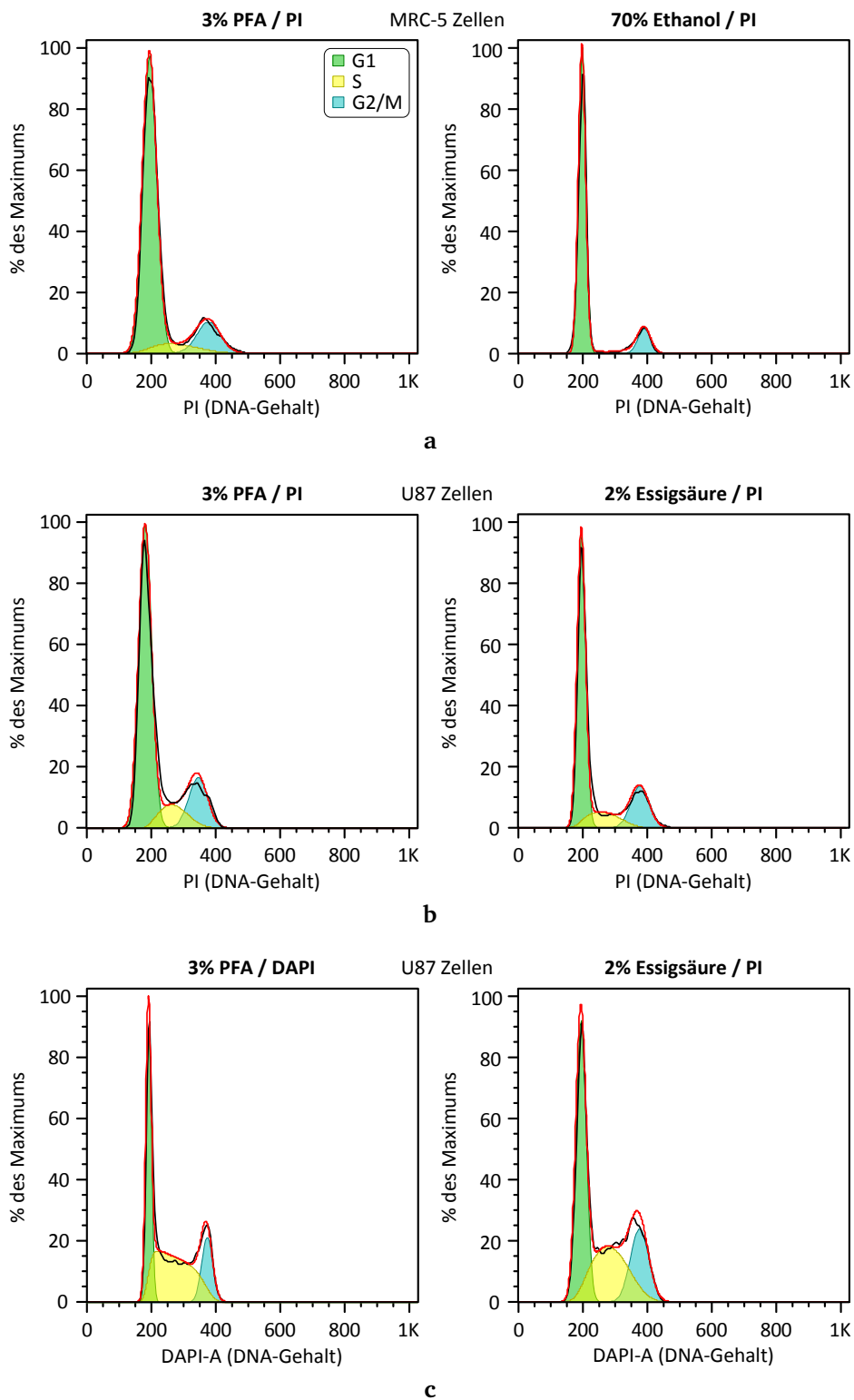


Abbildung 3.1. | Einfluss des Fixiermittels auf die Zellzyklusmessung. (a) Die Fixierung mit 70% Ethanol erlaubt im Vergleich zu 3% PFA eine schärfere Trennung der Zellzyklusphasen bei PI-Färbung in MRC-5 Zellen. (b) PFA-Fixierung und PI-Färbung führte in U87 Zellen zu ähnlich schlechten Ergebnissen wie in MRC-5 Zellen, bei Essigsäurefixierung war die Trennschärfe vergleichbar gut wie bei Ethanolfixierung. (c) DAPI-Färbung nach PFA-Fixierung bot eine noch bessere Trennschärfe.

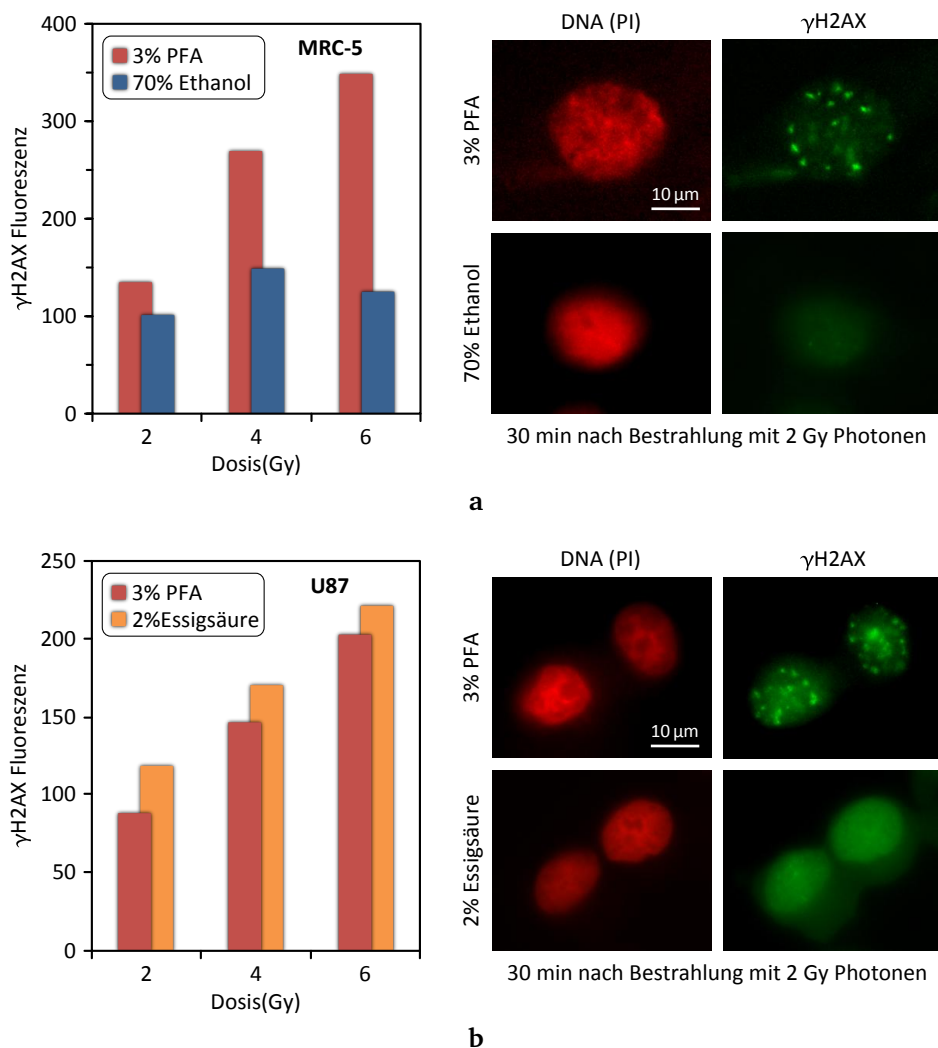


Abbildung 3.2. | Einfluss des Fixiermittels auf das γ H2AX-Signal. (a) Fixierung mit 3% PFA im Vergleich zu 70% Ethanol (MRC-5 Zellen) und (b) 3% PFA im Vergleich zu 2% Essigsäure (U87 Zellen). Die Diagramme zeigen die Fluoreszenzintensität des γ H2AX-Antikörpers 30 min nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen Photonen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen typische Ergebnisse der DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI) und des γ H2AX-Signal bei 2 Gy.

Lasertrennung vermied zusätzlich Signalüberlagerungen mit anderen Fluorophoren, weil die räumliche Trennung der optischen Pfade zu einer zeitlich leicht versetzten Messung der jeweils angeregten Fluorophore führt.

3.1.2. Erweiterte Apoptose-Messung

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 geschildert, wurde DNA-Fragmentierung als Endpunkt für die Apoptose herangezogen und anhand des subG1-Peaks im DAPI-Histogramm nachgewiesen. Neben der Apoptose können jedoch auch weitere Prozesse wie Nekrose oder andere Arten des programmierten Zelltods zur Fragmentierung der DNA führen, die nicht mit der Aktivierung von Caspasen einhergehen. Zur spezifischen Messung der Apoptose wurde die Immunfärbung deshalb um einen Caspase-3-Marker erweitert. Der verwendete Alexa Fluor 647-gekoppelte Antikörper bindet ausschließlich an die aktive Form (Casp3*).

Validierung der Apoptose-Messung

Um den Prozentsatz der Apoptose anhand des subG1-Peaks nicht zu überschätzen, ist es wichtig, kleine Zelltrümmer und apoptotische Körperchen von der Analyse auszuschließen. Dies kann durch einen Größenausschluss geschehen, doch wo die Grenze zu setzen ist zwischen Zelltrümmern und bereits geschrumpften, aber noch nicht komplett in apoptotische Körperchen zerfallenen Zellen, lässt sich nicht ohne Weiteres festlegen. Es stellte sich auch die Frage, wie gut sich mit dem verwendeten Casp3*-AK apoptotische von nicht apoptotischen Zellen unterscheiden ließen, und welches Bild sich durch den Vergleich mit der subG1-Quantifizierung ergäbe.

Zur Klärung dieser Fragen wurde in U87 Zellen mit Hilfe von SuperKillerTRAIL und MG132 gezielt Apoptose ausgelöst. Die Zellen wurden in T75-Flaschen bei etwa 80% Konfluenz mit $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ SuperKillerTRAIL plus $2,5 \text{ } \mu\text{M}$ MG132 behandelt. Beide Substanzen wurden dem regulärem Medium hinzugefügt. Unbehandelte Kontrollen wurden eingeschlossen. Die Zellen wurden 20 h lang im Brutschrank inkubiert und dann für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Eine Kontrolle unter dem Phasenkontrast-Mikroskop zeigte, dass die behandelten Zellen zu einem großen Teil kugelig aussahen, jedoch noch überwiegend am Flaschenboden anhafteten. Daneben fanden sich viele Zellen mit unauffälliger Morphologie, so wie sie auch die unbehandelten Zellen zeigten.

Um keine bereits vom Flaschenboden abgelösten Zellen zu verlieren, wurde das Medium nicht sofort verworfen, sondern in 50 mL Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Die Zellen in den Flaschen wurden routinemäßig abgelöst und ebenfalls in das Röhrchen gegeben, so wie das PBS, das vor und nach dem Einsatz der Trypsin-EDTA-Lösung zum Spülen des Flaschenbodens verwendet wurde. Die Röhrchen wurden 10 min bei $200 \times g$ und 7°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 6 mL PBS resuspendiert. Davon wurde je 1 mL in ein 15 mL Röhrchen überführt, um parallel zu der Immunfärbung nach PFA-Fixierung als Referenzmethode eine Apoptosemessung anhand des subG1-Peaks nach Nicoletti [180] durchzuführen:

Für die Nicoletti-Färbung wurden die Zellen nochmals zentrifugiert und nach Abgießen des Überstands in Nicoletti-Färbelösung resuspendiert. Im Gegensatz zu der Original-Rezeptur wurde $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI an Stelle von $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI als DNA-Farbstoff verwendet (in $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Natriumcitrat und 0,1% Triton-X 100). Die Nicoletti-Proben wurden bis zur Fertigstellung der übrigen Proben bei 4°C aufbewahrt.

Für die Immunfärbung wurden die Proben wie zuvor mit PFA-Lösung fixiert, mit 70% Ethanol permeabilisiert und nach 3 Waschschrritten erfolgte ein RNase-Verdau, diesmal mit 5 mL Volumen. Anschließend wurden die Proben in 5x 1 mL Portionen unterteilt, so dass neben der Komplettfärbung DNA/ γH2AX /Casp3* auch Einzelfärbungen und Leerkontrollen realisiert werden konnten. Die Extraproben dienten der Kompensation eventueller Signalüberlagerungen der verschiedenen Fluorophore. Der Casp3*-AK wurde wie der γH2AX -AK 1:20 in AK-Puffer ($30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA in PBS) verdünnt (für die Komplettfärbung in derselben Lösung). Die Antikörper-Inkubation und alle restlichen Schritte erfolgten wie zuvor beschrieben.

Bei der Immunfärbung zeigten die behandelten Zellen ein deutlich erhöhtes Casp3*-Signal gegenüber den Kontrollen, das bestätigte, dass der Antikörper funktionierte (siehe Abb. 3.3).

Außerdem wiesen die behandelten Proben einen klar definierten subG1-Peak auf, der sich leicht von Zelltrümmersignalen unterscheiden ließ: die Signale der Zelltrümmer waren kleiner und im Gegensatz zum subG1-Peak Casp3*-negativ (siehe Abb. 3.4).

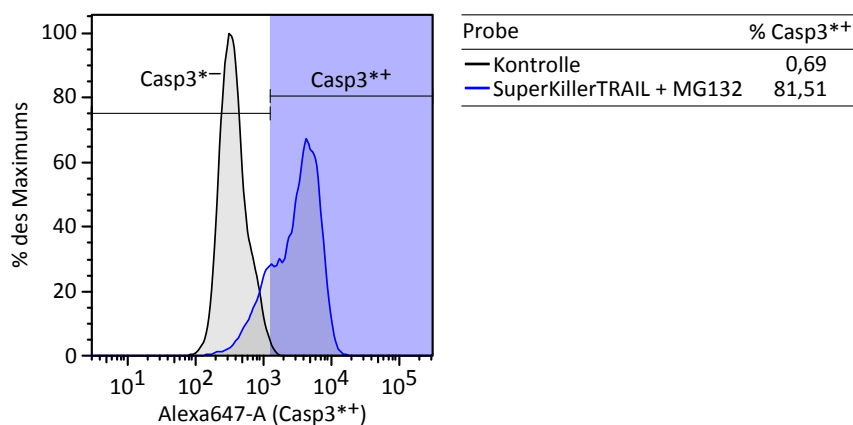


Abbildung 3.3. | Validierung des Casp3*-AK. Analyse von U87 Zellen 20 h nach Apoptoseinduktion mit MG132 und SuperKillerTRAIL: Einteilung in Casp3*-positive und -negative Ereignisse.

Die Abtrennung der Trümmer sollte jedoch nicht auf Grundlage des DAPI-Histogramms erfolgen, da die Einteilung bei kleinen Apoptoseraten weniger eindeutig ausfällt und das DAPI-A-Signal gewissen Schwankungen unterworfen ist (DAPI bindet stöchiometrisch an DNA, weshalb unterschiedliche Zellzahlen die Stärke des Signals beeinflussen, so dass die auf DAPI basierenden Gates für jede Probe angepasst werden müssen).

Die meisten Trümmer ließen sich in der Auftragung des Vorwärtsstreulichts (FSC-A) gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC-A) abtrennen (siehe Abb. 3.4). Während das in Durchflussrichtung gestreute Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe des registrierten Objekts darstellt, hängt die seitliche Streuung von der Granularität des Objekts ab. Zelltrümmer sind nicht nur kleiner als ganze Zellen, sie verursachen auch weniger Seitwärtsstreulicht, da beim Aufbrechen der Plasmamembran die Licht streuenden Bestandteile (hauptsächlich die Zellorganellen und andere membranumschlossene Kompartimente) voneinander getrennt werden. Daher traten besonders kleine SSC-A-Signale erst ab einem unteren FSC-A-Wert auf, der die Grenze zwischen intakten Zellen und Trümmern anzeigte.

Zur feineren Abtrennung weiterer Trümmersignale eignete sich die Auftragung DAPI-A gegen DAPI-W. Der Parameter DAPI-W gibt an, wie lange ein Objekt während seines Durchgangs durch die Durchflusskammer ein messbares Signal im DAPI-Detektor erzeugt; diese Dauer ist bei Zelltrümmern deutlich kleiner als bei ganzen Zellen und noch weitestgehend erhaltenen subG1-Zellen (siehe „Abknicken“ der Signale links unten in Abb. 3.4). Außerdem wurde die Auftragung DAPI-A gegen DAPI-W dazu benutzt zusammenhängende Zellen von Einzelzellen zu unterscheiden; insbesondere erlaubte dies die Abgrenzung von G1-Dubletten aufgrund ihres höheren DAPI-W-Signals im Vergleich zu Einzelzellen in der G2- oder M-Phase (allein auf Grund des DAPI-A-Signals ist dies nicht möglich).

Die Messungen ergaben einen klar definierten subG1-Peak in den behandelten Proben, der sich leicht von Zelltrümmersignalen unterscheiden ließ. Die Quantifizierung lieferte bei der Immunfärbung ähnliche Werte wie bei der Referenzmethode nach Nicoletti, wobei sich der subG1-Peak bei der Immunfärbung deutlicher von den Zellen ohne DNA-Fragmentierung abhob (siehe Abb. 3.5). Weiter zeigte sich bei der Immunfärbung ein Anstieg des Casp3*-

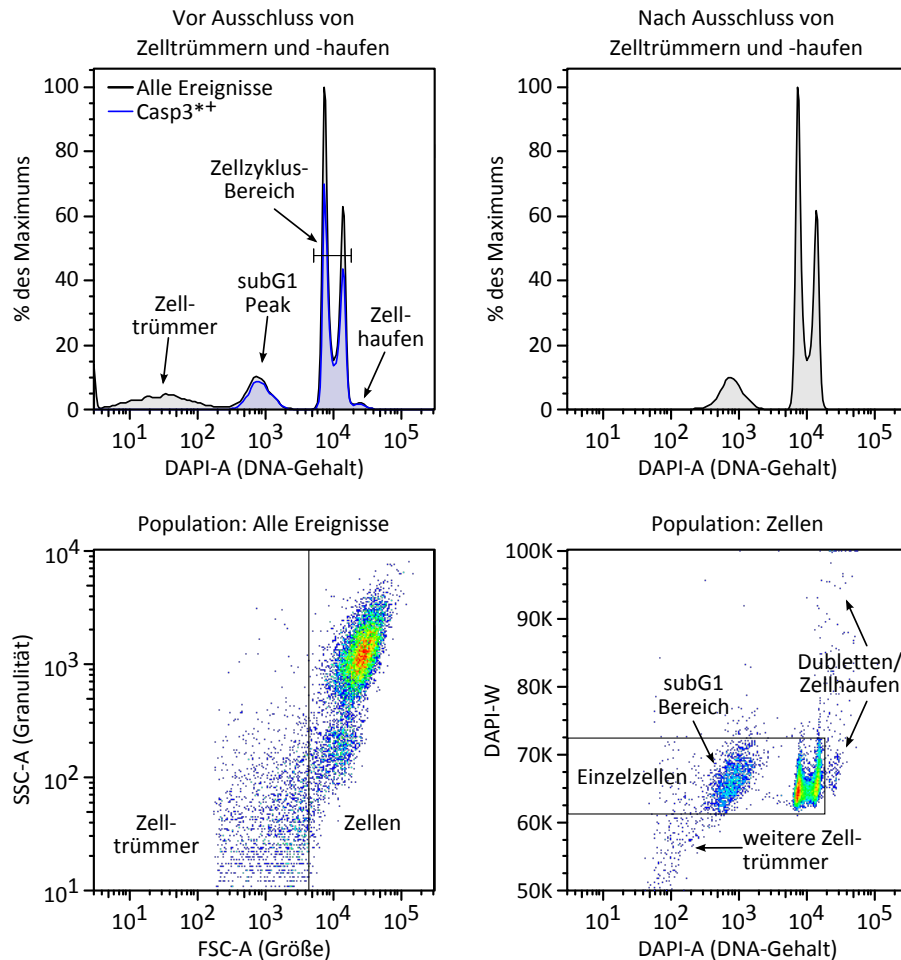


Abbildung 3.4. | Abtrennung von Zelltrümmern und -haufen zur korrekten Zellzyklus- und subG1-Analyse. Abgrenzung des subG1-Peaks von Zelltrümmern in U87 Zellen 20h nach Apoptoseinduktion mit MG132 und SuperKillerTRAIL.

Signale bei den behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen, der bestätigte, dass der Antikörper funktionierte (siehe Abb. 3.3). Die Casp3*-positiven Zellen überlagerten vollständig mit den denen im subG1-Bereich; die meisten Casp3*-positiven Zellen wiesen jedoch noch keine DNA-Fragmentierung auf. Dies zeigte, dass der Anteil der apoptotischen Zellen leicht unterschätzt werden kann, wenn nur der subG1-Bereich zur Bestimmung herangezogen wird. Dennoch ist die subG1-Messung unerlässlich für die Quantifizierung der abgeschlossenen Apoptose.

3.1.3. Erweiterte Zellzyklus-Messung

Aufgrund des gleichen DNA-Gehalts ist keine durchflusszytometrische Unterscheidung zwischen Zellen in der G2- und M-Phase möglich, die nur auf einem DNA-Farbstoff basiert. Um die γ H2AX-Expression während der Mitose gesondert zu betrachten, war daher ein zusätzlicher M-Phase Marker erforderlich. Ein solcher Marker war auch für die Auswertung von Zellzyklusblockaden am G2/M-Übergang wünschenswert. Grundsätzlich deutet ein Anstieg des G2/M-Peaks im Histogramm eines DNA-Farbstoffs auf einen G2/M-Arrest hin; die Interpretation wird jedoch erschwert, wenn es gleichzeitig zur Apoptose kommt, oder zusätzlich

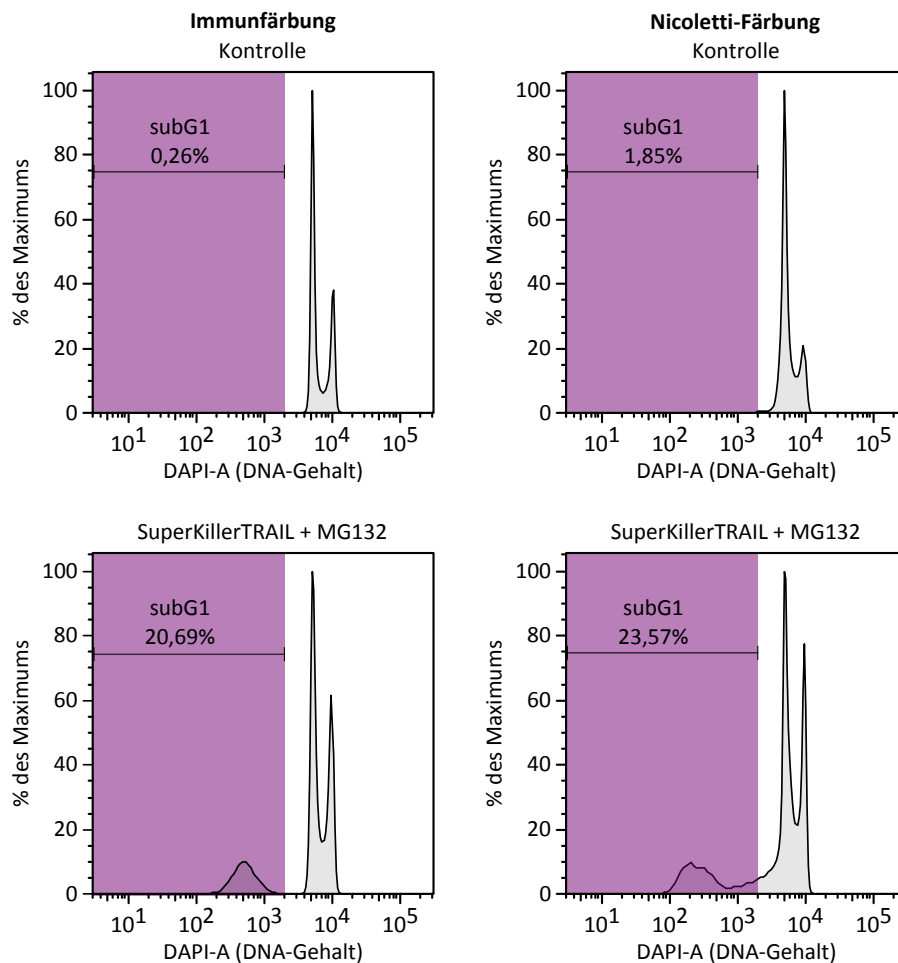


Abbildung 3.5. | Validierung der subG1-Messung. Analyse von U87 Zellen 20h nach Apoptoseinduktion mit MG132 und SuperKillerTRAIL. **Links:** Immunfärbung. **Rechts:** Referenzmethode nach Nicoletti. Die Ergebnisse stimmten gut miteinander überein.

Blockaden in anderen Zellzyklusphasen einsetzen. Beispielsweise kann die Überwindung einer G1/S-Blockade auch zu einer temporären Überhöhung des G2/M-Anteils führen, weil dann kurzfristig mehr Zellen für den Übergang in die nachfolgenden Phasen zur Verfügung stehen. Ein gleichzeitiger G2-Anstieg und M-Abfall ist hingegen eindeutig (analog verhält es sich mit G1/S-Blockaden).

Als Marker für die M-Phase wurde ein mit Alexa Fluor 555-konjugierter Phosphohiston-H3 (Ser10) Antikörper (pH3-AK) getestet. Die Phosphorylierung ist für die Chromosomenkondensation notwendig und bleibt während der gesamten Mitose erhalten. Der pH3-AK wurde zusammen mit den übrigen Antikörpern eingesetzt, so dass kein Extraschritt bei der Färbung erforderlich war. Die pH3-positive Zellen wiesen Signalstärken auf, die um mehr als eine Dekade größer waren als pH3-negative Zellen (siehe Abb. 3.6, Diagramm 7). Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde bestätigt, dass die pH3-positiven Zellen mitotisch waren.

3.1.4. Das vollständige Protokoll

Alle Zentrifugationsschritte wurden 5 min bei 7°C und 200x g durchgeführt. Die Zellen wurden in T25-Flaschen (3 Replikate) bestrahlt und nach der gewünschten Reparaturzeit mit

1 mL Trypsin-EDTA-Lösung geerntet, mit 3 mL Fixierlösung F gemischt und nach Vereinzelung durch Auf- und Ab-Pipettieren in ein Röhrchen überführt. Das Medium wurde in separaten Röhrchen (ÜS-Fraktion) zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 500 μL PBS resuspendiert und mit 1 mL Fixierlösung F gemischt. Die Zellen wurden 10 min bei RT inkubiert, dann zentrifugiert und in 3 mL eiskaltem 70% Ethanol resuspendiert (1 mL bei den ÜS-Fraktionen). Die Proben wurden auf Eis gesammelt und bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

Die ÜS-Fraktionen wurden mit den zugehörigen adhärenen Fraktionen vereinigt. Die Zellen wurden zentrifugiert und nach Entfernen des ÜS in Waschpuffer F (5g·L⁻¹ BSA in PBS) resuspendiert. Auf diese Weise wurden 3 Waschschrte durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 1 h lang bei 37°C in 1 mL RNase-Lösung (200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNase A in Waschpuffer F) inkubiert. Währenddessen wurde AK-Lösung hergestellt, indem $\gamma\text{H2AX-AK}$ 1:20, Casp3*-AK 1:20 und pH3-AK 3:200 in AK-Puffer IF (30g·L⁻¹ BSA in PBS) verdünnt wurde. Die Zellen wurden zentrifugiert, nach Entfernen des ÜS mit einer Kolbenhubpipette in 100 μL AK-Lösung resuspendiert und 1 h lang bei RT inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Proben stets im Dunklen gehalten.

Nach der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert, der ÜS wurde mit einer Kolbenhubpipette abgenommen und die Zellen wurden in 250 μL DAPI-Färbelösung F (1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAPI in PBS) resuspendiert. Die Suspensionen wurden durch das Zellsieb im Deckel spezieller FACS-Röhrchen (BD Falcon) pipettiert und auf Eis gestellt. Zur Messung wurde das Durchflusszytometer LSR II (BD) mit zugeschaltetem UV-Laser benutzt. Die Geräteeinstellungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1. | Einstellungen des LSR II Durchflusszytometers. λ : Wellenlänge, U: Elektrische Spannung, -A: Zeitintegral des Signals, -H: Maximalwert, -W: Signaldauer (von Eintritt des Objekts in den Laserstrahl bis zum Austritt), FSC: Vorwärtsstreulicht (front scatter), SSC: Seitwärtsstreulicht (side scatter), Angabe zu den optischen Bandpassfiltern: Mittlere Wellenlänge/Bandbreite in nm.

Parameter	Bedeutung	Anregungslaser		Detektor		Messwert		
		λ (nm)	P (mW)	Filter	U (V)	-A	-H	-W
FSC	Größe	488	100	488/10	50	✓	✓	
SSC	Granulität	488	100	488/10	50	✓	✓	
Alexa488	γH2AX	488	100	525/50	420	✓	✓	
Alexa555	pH3	561	150	586/15	420	✓	✓	
Alexa647	Casp3*	640	40	670/14	480	✓	✓	
DAPI	DNA	350	20	450/50	320	✓	✓	✓

3.1.5. Datenauswertung

Zur Datenauswertung wurde die Software FlowJo 7.6.5 verwendet. Signalüberlagerungen der unterschiedlichen Fluorophore wurden mit Hilfe der Kompensationsmatrix in Tabelle 3.2 korrigiert (ermittelt anhand einer Leerkontrolle ohne Fluoreszenzfärbung und Einzelfärbungen mit DAPI, $\gamma\text{H2AX-AK}$, pH3-AK oder Casp3*-AK). Die registrierten Ereignisse wurden anhand ihrer Messwerte in unterschiedliche Populationen (Gates) eingeteilt (siehe Abb. 3.6): Zelltrümmer und -haufen wurden von der Analyse ausgeschlossen (Zellen und Einzelzellen Gate), intakte Einzelzellen (Zellzyklus) wurden von Zellen mit fragmentierter DNA (subG1)

Tabelle 3.2. | Kompensationsmatrix für die Durchflusszytometrie. Aus der Matrix geht hervor, wie stark jedes Fluorophor zum jeweiligen Detektorsignal beiträgt. Die Werte sind so normiert, dass der Beitrag eines Fluorophors zu seinem vorgesehenen Detektor 100% beträgt.

Detektor	Signalzusammensetzung			
	Alexa488-A	Alexa555-A	Alexa647-A	DAPI-A
Alexa488-A	100	0,12	0,00	0,00
Alexa555-A	1,24	100	0,06	0,04
Alexa647-A	1,93	0,64	100	2,13
DAPI-A	0,03	0,02	0,02	100

unterschieden und einer Zellzyklusanalyse nach dem Dean-Jett-Fox Modell [181,182] unterzogen (DJF). Auf dieser Grundlage wurden die intakten Zellen zunächst in die Phasen G1, S und G2/M eingeteilt. Das G2/M-Gate wurde weiter unterteilt in pH3-positive mitotische Zellen (M) und G2-Zellen (G2/M ohne M entsprechend der logischen Verknüpfung $G2/M \wedge M^-$). Im Einzelzellen-Gate wurden außerdem Casp3*-positive (Casp3**+) und -negative (Casp3*-) Zellen unterschieden. Der Grenzwert wurde so gesetzt, dass die Replikate der Kontrollen im

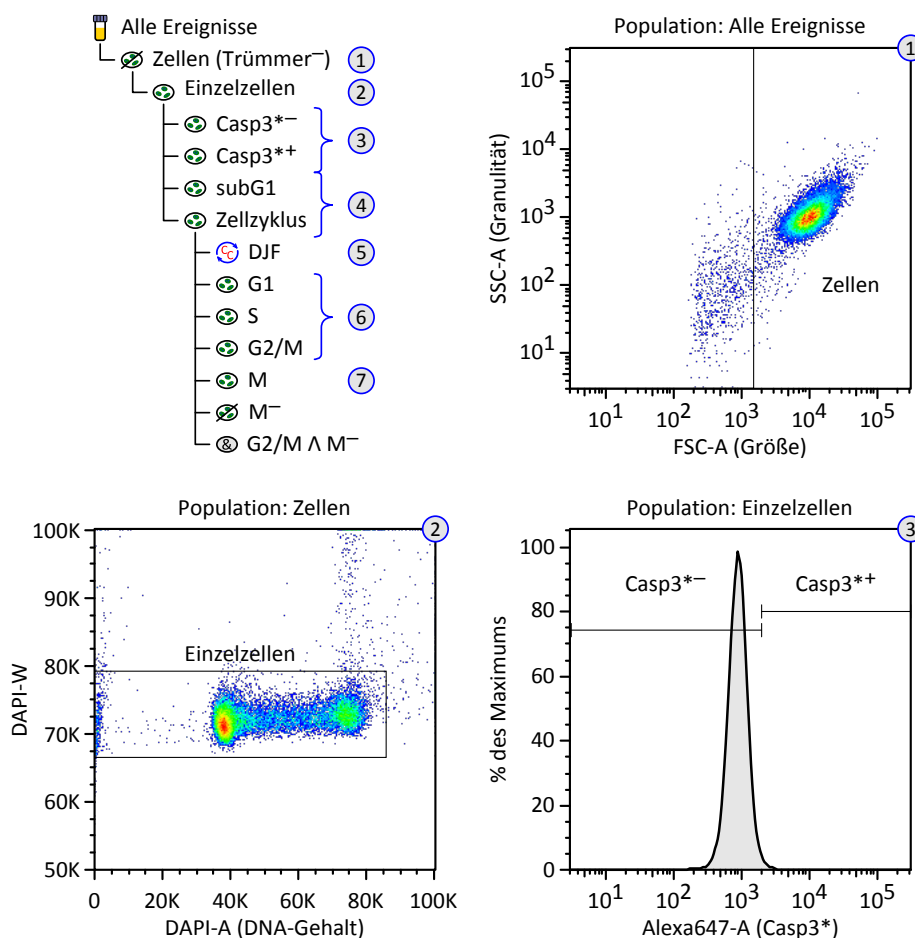


Abbildung 3.6. | FACS-Auswertung: Unterteilung der Subpopulationen. Die Diagramme zeigen die einzelnen Subpopulationen entsprechend der Hierarchie oben links (Fortsetzung auf Seite 67).

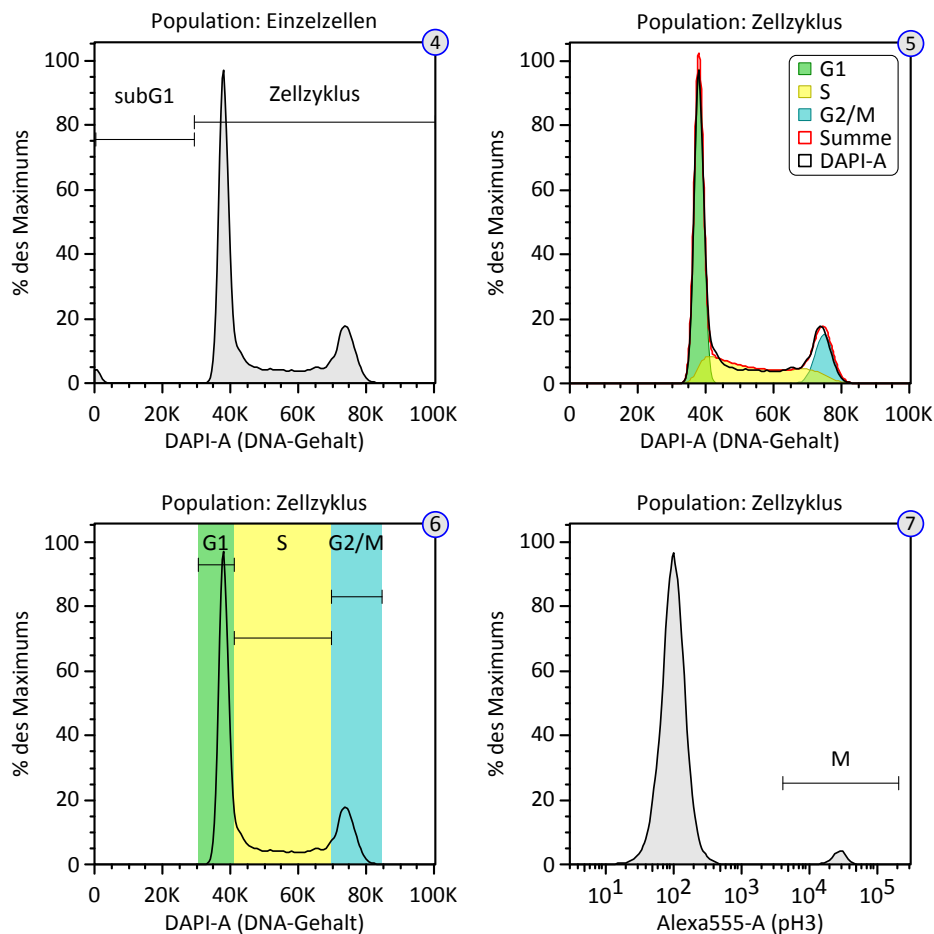


Abbildung 3.6. | (fortgesetzt)

Mittel 0,8% positive Zellen aufwiesen. Bei Zeitreihen, die Proben von verschiedenen Tagen nach Bestrahlung einschlossen, gab es zu jedem Tag eigene Kontrollen und einen angepassten Grenzwert. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Excel durchgeführt. Aufgrund der großen Datenmengen wurde hierzu eine Auswertungsvorlage erstellt.

Die γ H2AX-Intensität wurde auf den DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen normiert, indem der Median in der S-Phase durch 1,5 und in der G2- und M-Phase durch 2,0 geteilt wurde. Der Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen an allen intakten Einzelzellen wurde derart korrigiert, dass die Summe 100% ergab, ohne die Anteils-Verhältnisse zu verschieben; das Dean-Jett-Fox-Modell lieferte je nach Güte der Anpassung an die experimentellen Daten kleine Abweichungen (in der Regel betrug die Summe der Rohwerte mindestens 97%).

3.2. HCS Mikroskopie

Das Protokoll für die Immunfärbung von γ H2AX wurde für die routinemäßige Anwendung der High content screening (HCS) Mikroskopie optimiert. Es wurde getestet, wie stark sich verschiedene Protokollabwandlungen auf die Messergebnisse auswirken, um ein möglichst einfaches und robustes Protokoll für einen gesteigerten Durchsatz zu erarbeiten. Außerdem wurden Softwarelösungen zur effizienten Auswertung der Messdaten entwickelt.

3.2.1. Protokollabwandlungen der Immunfärbung und ihr Einfluss auf die Messergebnisse

Tabelle 3.3 enthält die getesteten Abwandlungen und beobachteten Effekte gegenüber dem Standardprotokoll in Abschnitt 2.5.4. Die Tests wurden mit U87 Zellen 30 min nach Bestrahlung mit 1 Gy Photonen im Vergleich zu unbestrahlten Proben durchgeführt.

Tabelle 3.3. | Protokollabwandlungen. Zur Optimierung der Immunfärbung für HCS Mikroskopie wurden die folgenden Änderungen gegenüber dem Standardprotokoll in Abschnitt 2.5.4 getestet.

#	Abwandlung gegenüber Standardprotokoll	Ergebnis
1	Standardprotokoll (keine Abwandlung)	—
2	Waschen ohne Tween 20 (nur PBS)	etwas weniger Hintergrund im Zytoplasma, deutlich größere Zellkerne (Fläche anhand DAPI-Färbung ~40% größer)
3	Blockierung mit 5mg·mL ⁻¹ BSA in PBS statt 30mg·mL ⁻¹	mehr Hintergrund im Zytoplasma
4	Permeabilisierung 15 min mit 90% Methanol, auf -20°C vorgekühlt	sehr ähnlich wie beim Standardprotokoll
5	Fixierung 30 min und ohne Saccharose in der PFA-Lösung	etwas weniger Hintergrund im Zytoplasma, Färbung von Zelle zu Zelle jedoch uneinheitlicher
6	Blockierung mit 30mg·mL ⁻¹ BSA in PBS und zusätzlich 0,1% Triton-X 100	etwas weniger Hintergrund im Zytoplasma, Foci jedoch diffuser

Die einzelnen Messergebnisse sind in den Abbildungen 3.8 und 3.7 dargestellt. Das Signal des Primärantikörpers (1°AK) wurde im grünen Kanal gemessen, das des Sekundärantikörpers (2°AK) im roten und das DAPI-Signal im blauen Kanal.

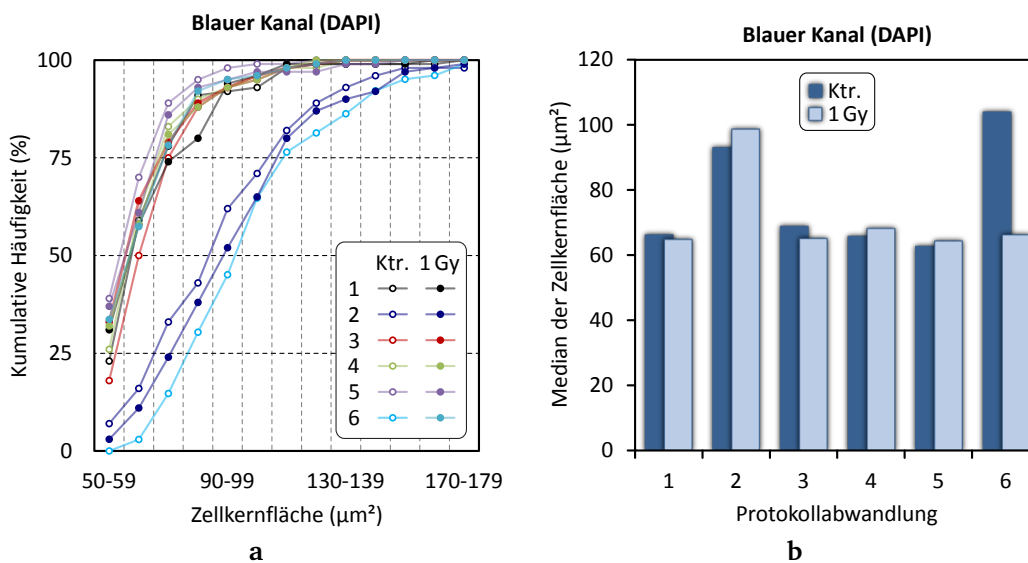


Abbildung 3.7. | Einfluss der Protokollabwandlungen auf die Zellkerngröße. (a) Kumulierte Häufigkeit und (b) Mediane der Zellkernfläche anhand der DAPI-Färbung in bestrahlten (1 Gy) und unbestrahlten (Ktr.) U87 Zellen. Protokollabwandlungen gemäß Tabelle 3.3.

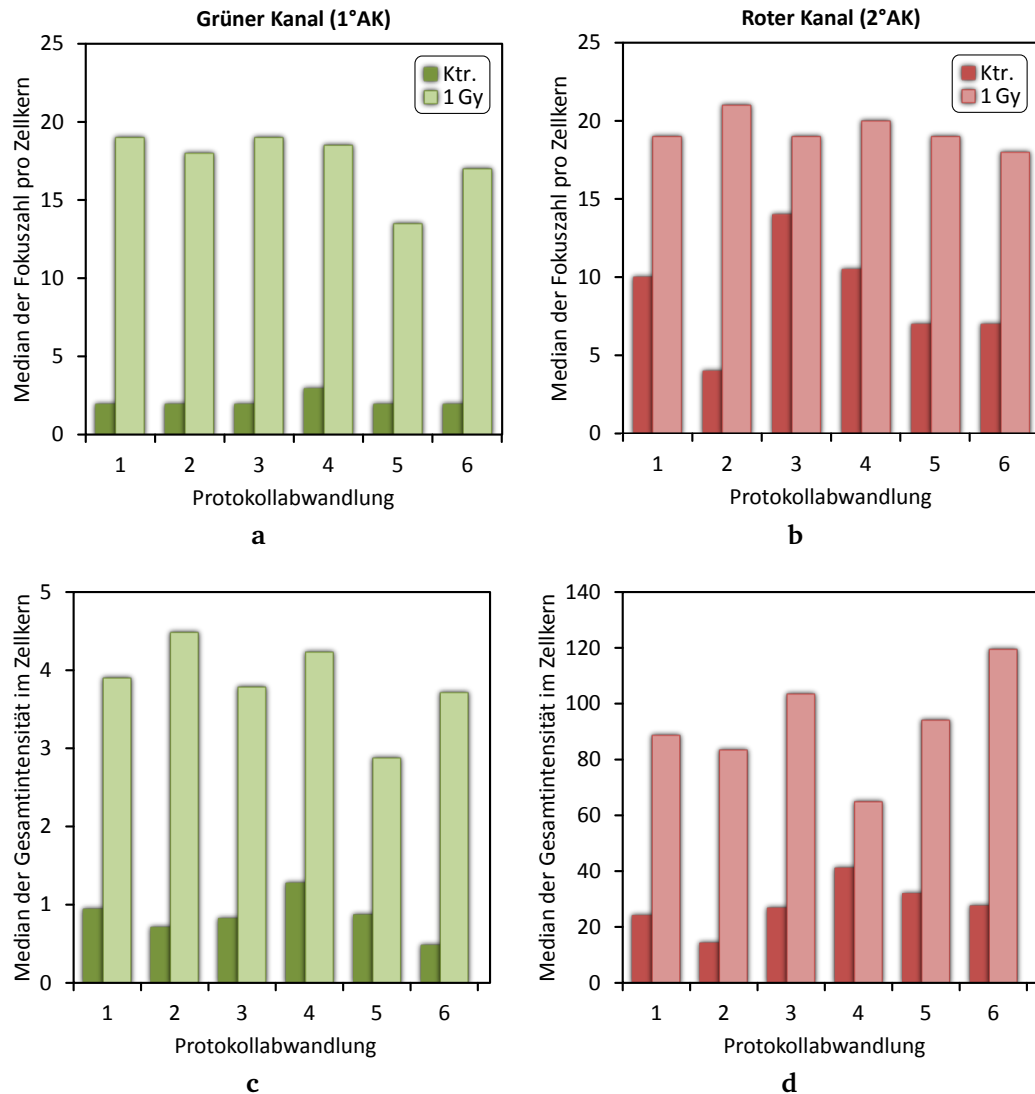


Abbildung 3.8. | Einfluss der Protokollabwandlungen auf das Ergebnis der γ H2AX-Färbung. (a, b) Mediane der Fokusanzahl und (c, d) Gesamtintensität im Zellkern in bestrahlten (1 Gy) und unbestrahlten (Ktr.) U87 Zellen bei Protokollabwandlungen gemäß Tabelle 3.3. (a) und (c) zeigen Messergebnisse im grünen Kanal (Primär-Antikörper), (b) und (d) im roten Kanal (Sekundär-Antikörper).

Die Protokollabwandlungen hatten nur geringfügigen Einfluss auf die Spezifität der Signale. Als vorteilhaft erwies sich, die Waschschritte mit PBS ohne Tween 20 durchzuführen (2), die BSA-Konzentration im IF-Puffer bei $30\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ zu belassen (3) und kein Triton-X 100 beizufügen (6). Waschen mit reinem PBS zog mitunter Benetzungsprobleme nach sich, die sich durch Zugabe von $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ vermeiden ließen. Eine zu lange Fixierungsdauer erwies sich als ungünstig, die Zugabe von Saccharose zur Fixierlösung (soll Schrumpfen der Zellen vermeiden) schien jedoch keinen Einfluss auf die Zellkerngröße zu haben, und war entbehrlich (5). Die alkoholische Permeabilisierung veränderte die Qualität der Färbung nicht, bot aber die Möglichkeit Proben über längere Zeit zu lagern und bei Bedarf Proben zu sammeln und gemeinsam zu färben (4). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz des γ H2AX-Primärantikörpers trotz geringerer Intensität gegenüber dem Signal des 2°AK eine sensiblere Unterscheidung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben ermöglichte.

Durch Verzicht auf die Sekundärfärbung konnte die Durchführung erheblich erleichtert und verkürzt werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde das nachfolgende Protokoll mit optimiertem Durchsatz für die HCS Mikroskopie erstellt.

3.2.2. Das optimierte Protokoll

Die Zellen wurden 10 min mit 3% PFA/PBS fixiert, kurz mit PBS gespült und in eiskaltes 70% Ethanol überführt (Lagerung bei 4°C in abgedichtetem Behälter möglich, mindestens 30 min Inkubation). Die Proben wurden in PBS rehydratisiert und anschließend 3x 10 min mit 5 gL⁻¹ BSA/PBS (Waschpuffer F) gewaschen. Die 1°AK-Inkubation erfolgte ÜN bei 4°C mit 1:100 verdünntem γ H2AX-Antikörper in 30mg·mL⁻¹ BSA/PBS (AK-Puffer IF) in einer feuchten Kammer. Es wurden 100 μ L Lösung pro Pipettierfeld aufgetragen. Es folgten 4x 10 min Waschschrte mit Waschpuffer F. Anschließend wurden die Proben kurz in deionisiertem Wasser geschwenkt und zur Färbung der Zellkerne für 10 s in 1 μ g · mL⁻¹ DAPI getaucht. Schließlich wurden die Präparate mit Fluoromount G eingedeckelt und nach dem Trocknen bei 4°C aufbewahrt.

3.2.3. Datenauswertung

Die Messergebnisse wurden als Tabellen im Textformat exportiert und zur statistischen Auswertung in Microsoft Excel eingelesen. Eine manuelle Auswertung ist jedoch sehr mühsam und zeitaufwändig, wenn viele Parameter und/oder Präparate auszuwerten sind. Deshalb wurde die komplette Datenauswertung mit Excel durch das Makro *Histogram* automatisiert, das in Visual Basic for Applications (VBA) geschrieben wurde. Es diente zunächst dazu für alle geöffneten Metafer-Tabellen die Häufigkeitsverteilungen und kumulativen Häufigkeiten zu einem beliebig auswählbaren Messparameter zu berechnen und in einem gemeinsamen Diagramm aufzutragen. Anhand der kumulativen Häufigkeit (Summenfunktionen) lässt sich auf einen Blick erkennen, wie gut sich die Messwertverteilungen von Replikaten miteinander decken, und wie deutlich sich unterschiedliche Probengruppen voneinander unterscheiden.

In der Endfassung des Makros werden auch die arithmetischen Mittelwerte und die Mediane der Verteilungen berechnet und in zwei separaten Säulendiagrammen dargestellt. Falls Replikate vorhanden sind, werden ihre Werte automatisch gemittelt und zusammen mit ihren Standardabweichungen aufgetragen. Damit dies gelingt, müssen die Tabellen zusammengehöriger Proben unmittelbar nacheinander in Excel geöffnet werden und nach dem Muster *Gruppe-Replikat.txt* benannt sein, d.h. die Bezeichnung der Probengruppe und der Replikate muss durch einen Bindestrich getrennt sein. Dies impliziert, dass kein Bindestrich in der Gruppenbezeichnung vorhanden sein darf; Replikatbezeichnungen unterliegen nicht dieser Restriktion, jedoch sollte eine schlichte Nummerierung in den meisten Fällen genügen.

Zur Auswahl des auszuwertenden Parameters muss nur die Überschrift in der entsprechenden Spalte ausgewählt werden, wobei es keine Rolle spielt, in welcher der Tabellen die Auswahl getroffen wird – die Bearbeitungsreihenfolge entspricht immer der Reihenfolge, in der die Dateien geöffnet wurden. Das Makro wird durch Anklicken einer Schaltfläche gestartet, die sich in die Schnellstartleiste oder eine separate Symbolleiste von Excel integrieren lässt. Mit *Histogram* lassen sich nicht nur Metafer-Tabellen auswerten, sondern ganz allgemein Messreihen, die in Spalten organisiert sind. Neben dem oben beschriebenen Einlesen der Spalten aus verschiedenen Dateien, können auch Excel-Arbeitsblätter verwendet werden,

die mehrere Tabellen enthalten. Dabei gelten die gleichen Bedingungen für die Reihenfolge ihrer Anordnung und das Muster ihrer Benennung, wie beim Öffnen mehrerer Dateien. Mit dieser Einlesevariante wurden z.B. auch Daten weiter ausgewertet, die durch supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie gewonnen wurden (siehe Abschnitte 3.4.7 und 3.4.8).

Neben Histogramm wurden einige weitere Makros für Excel implementiert, die den Umgang mit großen Datenmengen erleichtern. Mit ihnen lassen sich beispielsweise Tabellen aus mehreren Dateien schnell in einem Dokument zusammenfassen und Berechnungen in einer neuen Spalte auf alle Einzeltabellen übertragen. Hierdurch können auf einfache Weise Parameter ausgewertet werden, die sich aus mehreren Messgrößen zusammensetzen. Auch die Zusammenfassung mehrerer gleichartiger Messreihen zu einer Gruppen-Messreihe ist möglich.

3.3. Kombination von Durchflusszytometrie und HCS Mikroskopie

Um die knappe Strahlzeit, den Aufwand und Kosten zu minimieren, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die für die Durchflusszytometrie gefärbten Proben parallel zur mikroskopischen Auswertung zu nutzen. Dazu war es erforderlich, nach der Färbung ein Aliquot der Zellen auf einen Objektträger (OT) oder ein Deckglas (DG) aufzubringen und mit einem geeigneten Eindeckmedium ein mikroskopisches Präparat herzustellen. Fluoromount-G hatte sich als Eindeckmedium für die verwendeten Fluorophore bewährt (siehe Abschnitt 3.4.1) und sollte beibehalten werden. Aufgrund der hohen Viskosität von Fluoromount-G ließ sich die Zellsuspension jedoch nicht ohne Weiteres mit dem Eindeckmedium mischen (es kam zu Phasengrenzen oder dem Einschluss kleiner Luftblasen).

Die Zellen mussten deshalb zunächst auf der Glasoberfläche immobilisiert werden. Hierzu wurde ein spezieller Zentrifugeneinsatz (*Zytospin*) getestet, mit dessen Hilfe Zellen durch Zentrifugieren auf OT aufgebracht werden können. Das System erwies sich jedoch als zu aufwändig und zeitintensiv zur Verarbeitung einer größeren Probenstückzahl. Stattdessen wurden die Zellen auf DG luftgetrocknet. Hierbei kam es auf ein geeignetes Volumen der Zellsuspension an: war es zu groß, so entstanden Zellhaufen und die Zellen hafteten nicht gut an; war es zu klein, so ließen sich die Zellen nicht gut auf den DG verteilen. Zu geringe Zelldichten führten ebenfalls zu Benetzungsproblemen. Letztlich wurden ca. $1 \cdot 10^5$ Zellen in 20 μL auf 24x24 mm DG pipettiert, mit der Pipettenspitze verteilt und ÜN im Dunkeln bei RT getrocknet. Anschließend wurden die DG mit einem linsengroßen Tropfen Fluoromount-G benetzt und luftblasenfrei auf OT aufgelegt. Nach dem Gelieren des Eindeckmediums wurden die Präparate bei 4°C aufbewahrt.

Die so hergestellten Präparate eigneten sich für die Auswertung mit dem HCS-Mikroskop. Sie wiesen eine klare und starke Fluoreszenzfärbung auf, zeigten jedoch im Vergleich zu den rein für die Mikroskopie hergestellten Präparaten (gemäß Abschnitt 3.2.2) ein leicht erhöhtes Autofluoreszenzniveau und waren weniger bleichstabil. Für die supraauflösende Lokalisationsmikroskopie konnten sie nicht eingesetzt werden.

3.4. Superauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen einer Kooperation aus der Abteilung Ophthalmologie des Amyloidose-Zentrums der Universitätsklinik Heidelberg (Prof. Dr. Stephan Dithmar) und der AG Biophysik der Ge-

nomstruktur im Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg (Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer) wurde von Gerrit Best und Sabrina Rossberger ein neuartiges Mikroskop gebaut, das erstmals eine direkte Kombination von Strukturierter Beleuchtung (SIM) und Lokalisationsmikroskopie (SPDM) erlaubte [154]. Der Aufbau des Mikroskops ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es verfügt über einen Strahlengang zur Erzeugung und Manipulation der strukturierten Beleuchtung mit Hilfe eines Twyman-Green Interferometers (SIM-Modus), und einen alternativen Strahlengang mit homogener Ausleuchtung.

Welcher Strahlengang verwendet wird, kann durch Umklappen zweier Spiegel gewählt werden. Durch geeignete Wahl eines Graufilters kann die Beleuchtungsintensität variiert werden, so dass das Gerät bei homogener Ausleuchtung mit geringer Intensität als normales Auflichtmikroskop (Weitfeld-Modus) oder bei hoher Intensität als Lokalisationsmikroskop (SPDM-Modus) betrieben werden kann. Zur Beleuchtung konnte zum Zeitpunkt dieser Arbeit zwischen 3 Lasern mit den Wellenlängen 404 nm, 488 nm und 568 nm gewählt werden. Alle Funktionen des Mikroskops können computergestützt durch eine mit Python programmierte Software gesteuert werden.

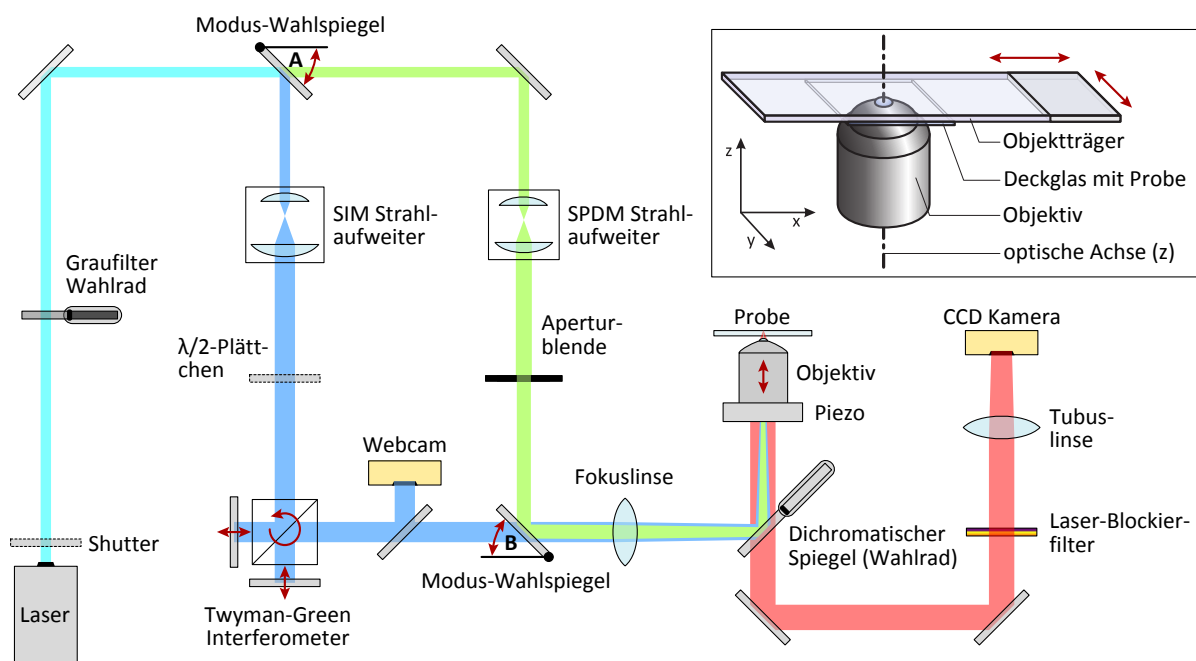


Abbildung 3.9. | Aufbau des SIM-SPDM Kombimikroskops. Durch Umklappen der Modus-Wahlspiegel A und B kann zwischen SIM (blauer Strahlengang) und homogener Beleuchtung (Weitfeld- bzw. SPDM-Modus, grüner Strahlengang) gewechselt werden. Das Twyman-Green Interferometer erzeugt die strukturierte Beleuchtung im SIM-Modus. Es verfügt über Stellantriebe zum Rotieren und Verschieben der Phase des Interferenzmusters. Mit dem vorangestellten $\lambda/2$ -Plättchen werden dabei entstehende Polarisierungseffekte ausgeglichen. Die Webcam nimmt ein Livebild des Interferenzmusters auf, das zur Kalibrierung der Stellantriebe dient. Die unbeschrifteten Elemente sind fest installierte Spiegel. Das Inlay oben rechts zeigt wie das Präparat einzulegen ist. Quelle: modifiziert nach [154].

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse beim Einsatz des Mikroskops waren einige Anforderungen an die Probenpräparation zu berücksichtigen. Insbesondere musste gewährleistet werden, dass die Fluorophore während den relativ langwierigen SIM-Aufnahmen bei normaler Beleuchtungsintensität kaum ausbleichen, im SPDM-Modus mit hoher Beleuchtungsintensität jedoch ein schnelles reversibles Bleichen (günstiges Blinkverhalten) zeigten.

3.4.1. Einfluss verschiedener Eindeckmedien auf das Bleich- und Blinkverhalten der Fluorophore

Da die chemische Umgebung der Fluorophore das Bleich- und Blinkverhalten der Fluorophore maßgeblich beeinflusst, wurden verschiedene Eindeckmedien auf ihre Eignung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4. | Einfluss verschiedener Eindeckmedien auf das Bleich- und Blinkverhalten der Fluorophore Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647. WF: im Weitfeldmodus (geringe Beleuchtungsintensität). LM: im SPDM-Modus (hohe Beleuchtungsintensität zur Anregung des Blinkens).

Eindeckmedium	Beobachtungen	
	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 647
Fluoromount-G (Southern Biotech)	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen, gefolgt von regem, hellem Blinken, das nach einiger Zeit seltener auftritt. Oft dauern einzelne Blinkereignisse einige hundert ms, während denen Helligkeitsschwankungen zu beobachten sind.	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen ohne Blinken
Immu-Mount (Thermo Scientific Shandon)	WF: starkes Leuchten der Plasmamembran, das die Foci im Kern überlagert. LM: schnelles Ausbleichen, gefolgt von regem Blinken, das auch nach langer Belichtungszeit anhält. Die Blinkereignisse sind typischerweise sehr hell und kurz (< 100 ms).	WF: starkes Leuchten der Plasmamembran, das die Foci im Kern vollkommen überdeckt. LM: schnelles Ausbleichen ohne nennenswertes Blinken
Switching Buffer*	WF: schwache Signale, die von Hintergrundfluoreszenz überlagert werden. LM: schnelles Ausbleichen ohne Blinken	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen, gefolgt von regem Blinken, das auch nach langer Belichtungszeit anhält. Die Blinkereignisse dauern typischerweise einige hundert ms.
SB⁻*	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen ohne Blinken	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen, gefolgt von regem Blinken, das auch nach langer Belichtungszeit anhält. Die Blinkereignisse dauern tendenziell kürzer als bei Verwendung von Switching Buffer.
MEA-Eindeckmedium*	WF: klar erkennbare Foci, wenig Hintergrund. LM: schnelles Ausbleichen ohne Blinken	WF: schwache Signale mit schlechtem Signal/Rausch-Verhältnis. LM: relativ helles Blinken, auch nach langer Belichtungszeit. Einzelne Blinkereignisse dauern typischerweise ~100 – 300 ms.

*Herstellung siehe Abschnitt 2.5.3; da es sich um dünnflüssige Eindeckmedien handelt, wurden die Präparate mit Nagellack versiegelt.

Alexa Fluor 647 zeigte ein gutes Blinkverhalten in Switching Buffer, SB⁻ und MEA-Eindeckmedium, jedoch nicht in Fluoromount-G. Für Alexa Fluor 488 verhielt es sich umgekehrt, so dass diese Fluorophorkombination keine Lokalisationsaufnahmen für 2 Kanäle erlaubte. Immunmount kam aufgrund des starken unspezifischen Leuchtens der Plasmamembran nicht in Frage. Fluoromount-G erwies sich im Hinblick auf die SIM-Anforderungen dank des geringen Bleichens im Weitfeldmodus als geeignetster Kompromiss und wurde daher weiterhin verwendet.

3.4.2. Optimierung und Erweiterung der Immunfluoreszenz-Färbung

Um eine hohe Signalstärke und -spezifität zu gewährleisten, wurde die Immunfärbung von γ H2AX für die supraauflösende Mikroskopie optimiert. Außerdem wurde sie um die Anfärbung von Phospho-BRCA1 (Ser1524), kurz pBRCA1, erweitert. Es handelt sich dabei um die aktivierte Form eines DSB-Reparaturenzyms aus der Homologen Rekombination (siehe Abschnitt 1.5.1 in der Einleitung).

Die Signalstärke und Bleichstabilität konnte durch den Einsatz von Sekundärantikörpern (2°AK) ausreichend verstärkt werden. Im Falle der γ H2AX-Färbung war dieser gegen Maus IgG gerichtet, und wie der Primärantikörper (1°AK) mit Alexa Fluor 488 Fluorophoren gekoppelt (AF488-Anti-Maus AK); der pBRCA1 2°AK band spezifisch an IgG aus dem Kaninchen und war mit Alexa Fluor 594 markiert (AF594-Anti-Kaninchen AK). Zur Verbesserung der Spezifität der 2°AK Bindung, und zur Verminderung von Autofluoreszenz, wurden die Präparate vor der eigentlichen Immunfärbung mit Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen) behandelt. Gegenüber der herkömmlichen Färbung ermöglichte dies den Einsatz von erheblich größeren Antikörpermengen, und somit einer wesentlich höheren Fluorophordichte, ohne Zunahme von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz (siehe Abb. 3.10). Die optimalen Konzentrationen für Primär- und Sekundärantikörper wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen in Vorversuchen festgelegt.

3.4.3. Das optimierte Protokoll

DG mit Zellen wurden aus dem Medium entnommen, mit 2 mL PBS gespült, und 15 min lang mit 3% PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden die DG mit 2 mL PBS gespült und mit 70% Ethanol (vorgekühlt auf -20°C) mindestens 60 min inkubiert, oder für längere Zeit bei 4°C gelagert. Die DG wurden in eine Färbekammer überführt und zur Rehydratisierung und Entfernung des Alkohols über einen Zeitraum von 40 min 3x mit 100 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf den DG mit einem Tropfen Image-iT FX Signal Enhancer (Invitrogen) auf einer Lage Parafilm benetzt, und in einer feuchten Kammer 30 min lang bei RT inkubiert.

Es folgten 3x 5 min Waschschrte mit Waschpuffer F (5 g·L⁻¹ BSA in PBS). Während den Waschrten wurde die 1°AK-Lösung vorbereitet. Dazu wurde der γ H2AX-AK (Maus) 1:100 und der pBRCA1-AK (Kaninchen) 1:500 in AK-Puffer IF (30 mg·mL⁻¹ BSA in PBS) verdünnt. Die DG wurden ÜN mit 50 μ L AK-Lösung auf Parafilm in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die DG 3x 5 min mit Waschpuffer F gewaschen und die 2°AK wurden in AK-Puffer IF verdünnt: AF488-Anti-Maus AK wurde 1:250 eingesetzt und AF594-Anti-Kaninchen AK 1:1000. Die Sekundärfärbung erfolgte wie zuvor mit 50 μ L AK-Lösung auf Parafilm. Die Inkubation wurde 90 min bei RT durchgeführt.

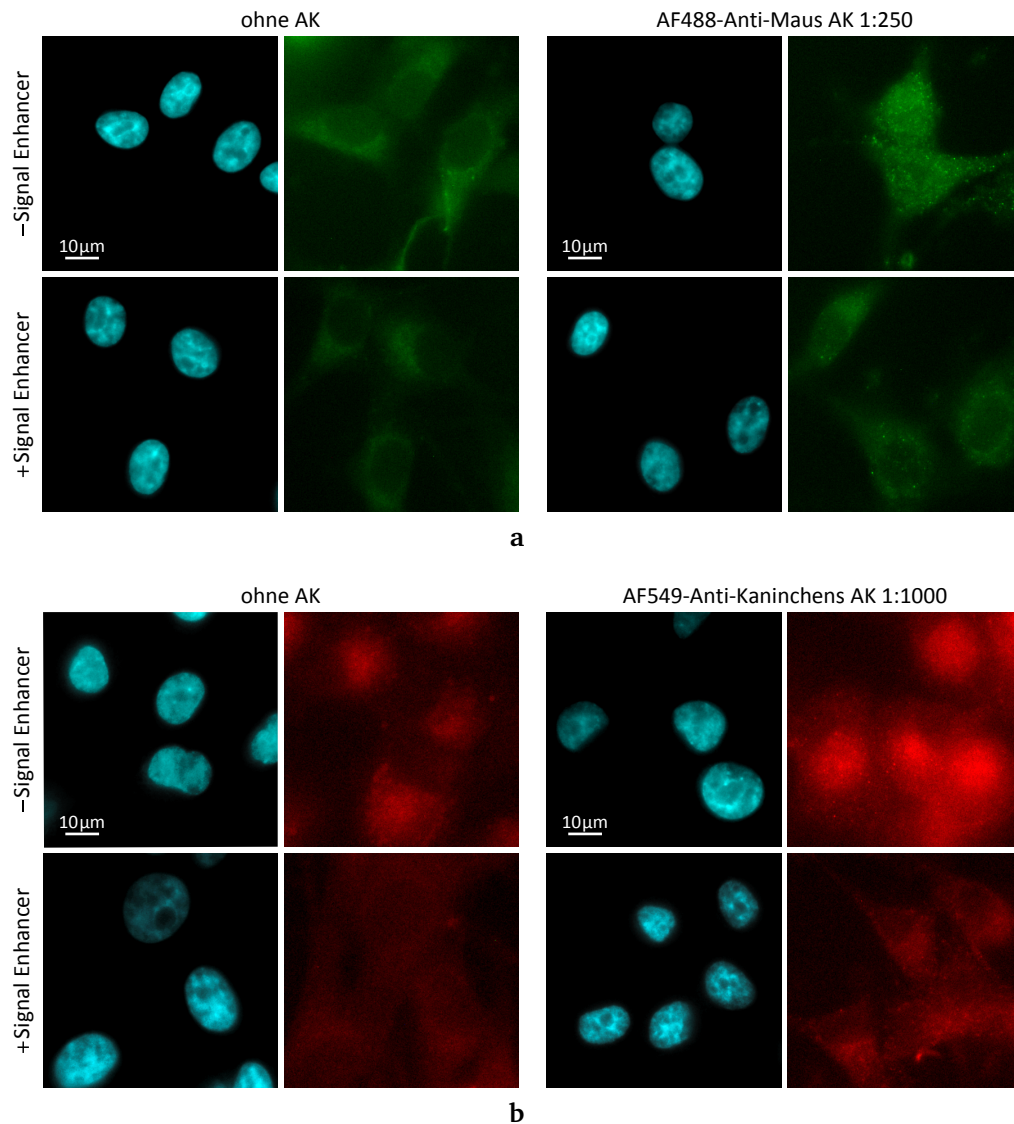


Abbildung 3.10. | Optimierung der Immunfärbung für 3D-SIM. Unbestrahlte U87 Zellen wurden mit oder ohne den Blockierungsschritt mit Image-iT FX Signal Enhancer präpariert (+/- Signal Enhancer). Die 1°AK-Inkubation wurde ausgelassen, so dass die Aufnahmen rechts neben den Abbildungen der Zellkerne (DAPI-Kanal) ausschließlich Autofluoreszenz und unspezifische Bindungen des 2°AK zeigen. Die Belichtungszeit wurde aufgrund der schwachen Fluoreszenz sehr lang gewählt (grüner Kanal: 5 s, roter Kanal: 2 s) und lag somit um ein Vielfaches höher als bei normalen Präparaten. (a) grüner Kanal (AF488-Anti-Maus AK), (b) roter Kanal (AF549-Anti-Kaninchen AK).

Die DG wurden abermals 3x 5 min mit Waschpuffer F gewaschen, kurz in deionisiertem Wasser geschwenkt, und zur Gegenfärbung der Zellkerne 15 min mit 50 µL DAPI-Färbelösung M ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DAPI) bei RT auf Parafilm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde überschüssige DAPI-Lösung durch Schwenken der DG in deionisiertem Wasser entfernt, und die DG wurden mit einem linsengroßen Tropfen Fluoromount-G auf Objektträgern eingebettet. Die Präparate wurden bei RT luftgetrocknet und dann bei 4°C gelagert.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die γH2AX -Färbung während der SIM-Aufnahme kaum ausbleichte (siehe Abb. 3.14b in Abschnitt 3.4.7), so dass es möglich war im Anschluss eine Lokalisationsaufnahme derselben Zelle anzufertigen (siehe nächster Abschnitt).

3.4.4. Aufnahmesequenz am SIM-SPDM Kombimikroskop

In der vorliegenden Arbeit wurde die erste große Versuchsreihe mit dem SIM-SPDM Kombimikroskop durchgeführt: Mit Hilfe des optimierten Protokolls zur Immunfärbung aus Abschnitt 3.4.2 wurden DSB-Reparaturfoci in U87 Zellen untersucht, die zu verschiedenen Zeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 26 h) nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen am SNAKE fixiert worden waren (zur Durchführung der Bestrahlung siehe Abschnitt 2.3). Von jedem Zeitpunkt, sowie einem Kontrollpräparat mit unbestrahlten Zellen, wurden mindestens 15 Zellen aufgenommen.

Außerdem wurden zwei weitere Präparate mit bestrahlten Zellen eingeschlossen, von denen je 5 Zellen aufgenommen wurden: bei einem wurde die pBRCA1-Färbung weggelassen (γH2AX -Einzelfärbung), beim Anderen fehlte die γH2AX -Färbung (pBRCA1-Einzelfärbung). Diese Proben dienten zur Beurteilung bzw. Kompensation eventueller Signalüberlagerungen der beiden Immunfluoreszenzfärbungen; es konnten keine nennenswerten Störeffekte dieser Art festgestellt werden (siehe Abb. 3.11).

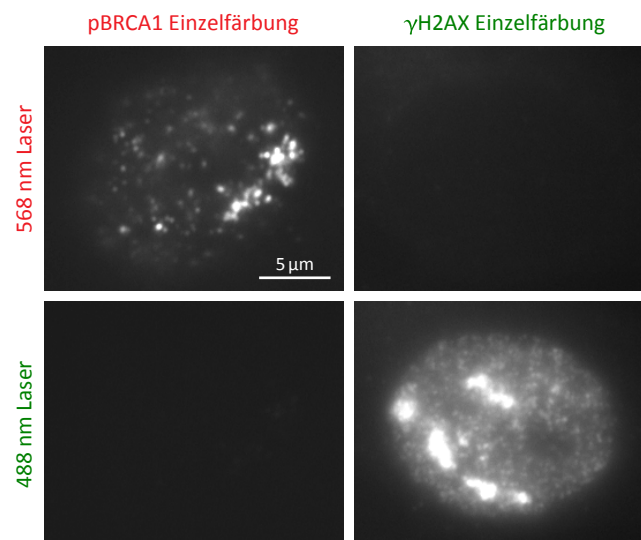


Abbildung 3.11. | Kontrolle von Signalüberlappungen bei der SIM-Aufnahme. Die pBRCA1-Einzelfärbung (links) zeigte kein nennenswertes Signal im γH2AX -Kanal (unten); umgekehrt wurde bei der γH2AX -Einzelfärbung (rechts) keine Signalüberlappung mit dem pBRCA1-Kanal (oben) festgestellt. Gezeigt sind die Summenbilder aller Aufnahmen zu einer Z-Position im jeweiligen Kanal; sie sind übersättigt dargestellt, damit auch sehr schwache Signale erkennbar sind.

Die verwendete Aufnahmesequenz ist in Tabelle 3.5 spezifiziert. Das Interferenzmuster der Beleuchtung im SIM-Modus bestand aus sinusförmigen Helligkeitsschwankungen, die wie ein Gitter parallel verlaufende Beleuchtungsstreifen bildeten (siehe Abb. 3.12). Die Gitterkonstante des Beleuchtungsmusters (Abstand zwischen 2 Helligkeitsmaxima) betrug 350 nm im Falle des 488 nm Lasers und 400 nm für den 568 nm Laser. Im SIM-Modus wurden 3D-Aufnahmen der Zellen erstellt, indem das Objektiv in 200 nm Schritten entlang der optischen Achse (Z-Achse) verschoben wurde.

Zu jeder Z-Position wurden 9 Bilder aufgenommen, die sich aus Aufnahmen bei 3 verschiedenen Rotationswinkeln mal 3 Phasenverschiebungen des Beleuchtungsmusters ergaben. Die Rotationswinkel betragen 0° (senkrechte Streifen auf dem Kamerabild), 60° und -60° , und die Phasenverschiebungen 0° , 120° und 240° . Nach Aufnahme dieser Bilderserie mit dem 568 nm

Tabelle 3.5. | *Aufnahmesequenz am SIM-SPDM Kombimikroskop. Reihenfolge und Aufnahmeparameter der unterschiedlichen Beleuchtungsmodi. Verschiedene Kanäle sind farblich hervorgehoben.*

#	Beleuchtung	Färbung/Anregungswellenlänge (nm)	Aufnahmemodus	Integrationszeit (ms)	Laserleistung (mW)* / Graufilter (% Transm.)
1	SIM	pBRCA1/568	3D	200	100/~1.56
		γ H2AX/488	3D	200	100/~0.02
2	Weitfeld	DAPI/404	3D	500	200/100
3	Weitfeld	DAPI/404	2D	500	200/100
4	SPDM	γ H2AX/488	2D Zeitreihe (2000 Bilder)	100	100/100
5	Weitfeld	DAPI/404	2D	500	200/100

*Es treten Leistungsverluste durch die optischen Elemente zur Strahlformung auf (vor allem im SIM-Modus), so dass die Beleuchtungsleistung kleiner war als die allein durch den Graufilter geminderte Laserleistung.

Laser (pBRCA1-Färbung) wurde die Prozedur mit dem 488 nm Laser (γ H2AX-Färbung) wiederholt, und alle Aufnahmen wurden gemeinsam als 3D Bildstapel in eine Datei im Khoros Datenformat (KDF) abgespeichert.

Aufgrund der geringen Kohärenzwellenlänge des UV-Lasers, und seiner mäßigen Eignung für den verwendeten Anregungsfilter, konnte die Zellkernfärbung mit DAPI nicht im SIM-Modus aufgenommen werden. Deshalb wurde im Anschluss an die SIM-Aufnahme ein 3D-Bild des Zellkerns im Weitfeldmodus aufgenommen, das später entfaltet wurde (siehe Ab-

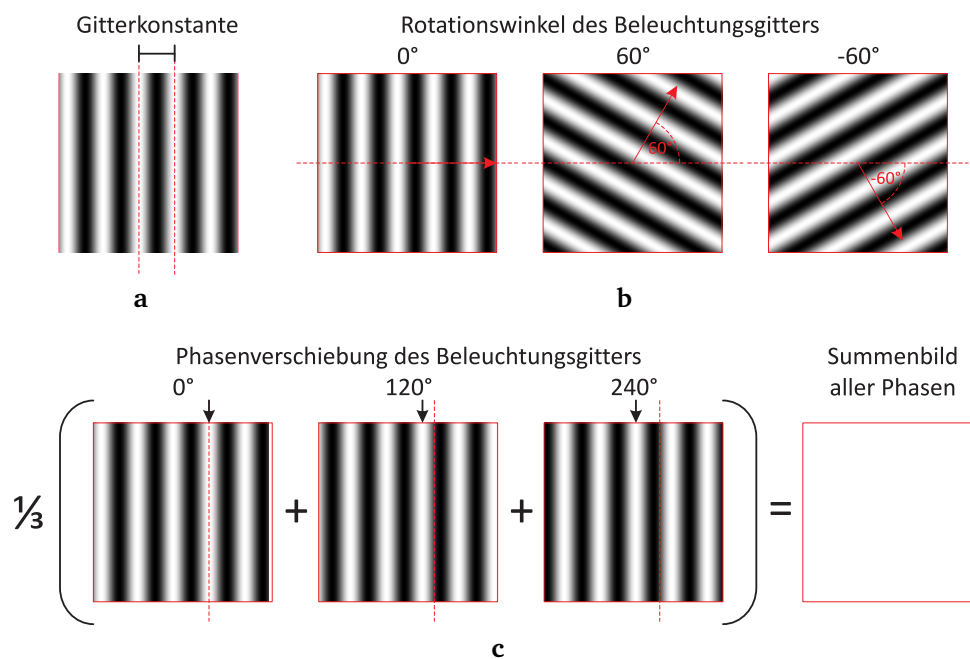


Abbildung 3.12. | *SIM Beleuchtungsmuster und Aufnahmesequenz.* (a) Durch Interferenz wurden sinusförmig modulierte Helligkeitsstreifen mit festgelegter Gitterkonstante erzeugt. (b) Die Modulationsrichtung des Gitters (siehe Pfeile) wurde um 0° , 60° und -60° rotiert. (c) Die Phase wurde jeweils um 0° , 120° und 240° verschoben, so dass sich in der Summe eine homogene Beleuchtung ergab. Pro Aufnahmekanal resultierten 9 Bilder von jeder Z-Position. Zuerst wurde die Phase variiert, dann die Z-Position, die Gitterrotation und schließlich der Kanal.

schnitt 3.4.5). Die zusätzlichen 2D DAPI-Bilder vor und nach der SPDM-Aufnahme (an gleicher Z-Position) dienen der Berechnung eines Driftvektors zur Korrektur eventueller Verschiebungen des Objektisches während der SPDM-Aufnahme. Zur Driftkorrektur während der SIM-Aufnahmen waren aufgrund der besonderen Aufnahmesequenz keine zusätzlichen Korrekturbilder erforderlich (siehe Abschnitt 3.4.5).

3.4.5. Auswertelgorithmen

Zur Auswertung der Aufnahmen wurden diverse Algorithmen in MATLAB implementiert, die sich in die Aufgabenfelder *Rekonstruktion*, *Korrektur*, *Visualisierung* und *Analyse* einteilen lassen (siehe Tab. 3.6). Es gibt allgemeine Funktionen, Funktionen für spezielle Aufnahmetypen, und solche, die der Kombination von SPDM- und SIM-Aufnahmen dienen. Eine vollständige Liste mit detaillierten Funktionsbeschreibungen befinden sich in Anhang A.1.

Für größtmögliche Flexibilität wurden die Funktionen modular angelegt, d.h. es gibt Kernfunktionen, die von spezialisierteren Funktionen benutzt werden, um komplexere Aufgaben zu lösen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Automatisierung von Prozessschritten gelegt; deshalb wurden alle wesentlichen Funktionen so angelegt, dass sie nicht nur für einzelne Aufnahmen ausgeführt werden können, sondern auch für alle Aufnahmen im selben Ordner, oder in allen Unterordnern eines bestimmten Pfads. Um dies zu ermöglichen, weisen viele Funktionen eine Standardschnittstelle auf, so dass sie von Erweiterungsfunktionen zur Stapelverarbeitung aufgerufen werden können, die im Folgenden als *Batchfunktionen* bezeichnet werden.

Als Standardschnittstelle wurden die ersten 3 Eingabeargumente auf die Variablen *inPath*, *fnPattern* und *outPath* festgelegt. Sie definieren den Pfad eines Quellordners, ein oder mehrere Namensmuster zur Erkennung der zu bearbeitenden Dateien, und einen Ausgabeordner. Darüber hinaus benötigen einige der erweiterbaren Funktionen zusätzliche Argumente; diese werden von den Batchfunktionen als *varargin* (MATLAB-spezifische optionale Variablenliste flexibler Länge) aufgenommen und zu den erweiterbaren Funktionen durchgereicht.

Die Batchfunktionen arbeiten mehrere Aufnahmen nacheinander ab und übergeben sie der zu erweiternden Funktion. Außerdem protokollieren sie den Verlauf des Vorgangs, sowie eventuell aufgetretene Fehler, und fassen teilweise Ergebnisse einzelner Bearbeitungsschritte zusammen. Diese Zusatzinformationen werden in separaten Dateien abgelegt, die dem Experimentator als Kontrolle dienen und in einigen Fällen für nachfolgende Schritte zur Bildauswertung benötigt werden (Details hierzu sind der Dokumentation der Funktionen im Anhang unter A.1 zu entnehmen). Es wurden allgemeine Batchfunktionen implementiert, mit denen sich mehrere Funktionen erweitern lassen, und solche, die für spezielle Funktionen und Aufgaben vorgesehen sind.

3.4.6. Entfaltung der 3D-Weitfeld-Aufnahmen

Die 3D-Aufnahmen der Zellkerne (DAPI-Färbung) im Weitfeldmodus wurden mit der Funktion `Deconvolve` entfaltet. Ihre Batchfunktion `DeconvolveDir` startet die Entfaltung aller Aufnahmen innerhalb eines Dateordners; sie kann wiederum mit `BatchFolders` erweitert werden, um mehrere Ordner auf einmal zu bearbeiten. Die eigentliche Entfaltung wird von der Funktion `GenericDeconvolution` von Rainer Heintzmann durchgeführt. Dabei wird eine simulierte Punktbildfunktion (PSF) zu Grunde gelegt, die anhand der charakteristischen

Tabelle 3.6. | Algorithmenübersicht. Einteilung der wichtigsten MATLAB-Funktionen, die zur Verarbeitung supraauflösender Mikroskopie-Aufnahmen implementiert wurden. Eine vollständige Liste mit detaillierten Funktionsbeschreibungen befinden sich im Anhang unter A.1.

	Aufgabenfeld	Funktion	Batchfunktion (Ebene 1/Ebene 2)
SIM	Rekonstruktion	PrepareSIMrecon	BatchFolders
		CreateResultFiles	BatchFoldersToFiles oder BatchCreateResultFiles
	Korrektur	CorrectSIMbleach	BatchCorrectSIMbleach/ BatchFolders
		CorrectSIMdrift	BatchCorrectSIMdrift BatchFolders
	Visualisierung	WriteResultTiffs	BatchFolders
		WriteResultTiffs IndividualScale	BatchFolders
WriteImgs2Collage		BatchFolders	
SPDM	Korrektur	Fast_MFP	BatchFilesInFolder/ BatchFolders
		CorrectDriftOrte	OrteDriftCorrection/ BatchFolders
	Visualisierung Analyse	Orte2SymbolMap	BatchEvaluateFoci/ BatchFolders
		EvaluateFoci	BatchEvaluateFoci/ BatchFolders
SIM-SPDM- Kombination	Korrektur	CorrectShiftMatchZ	
	Visualisierung	CombineSIMspdm	BatchSaveOrteSIM
3D Weitfeld	Korrektur	Deconvolve	DeconvolveDir/ BatchFolders
	Visualisierung	ImgStack2Collage WriteImgs2Collage	
Allgemein	Analyse	PixelsAboveTH	BatchMeasure
		CollectIntInfo	BatchMeasure

Emissionswellenlänge des Fluorophors (460 nm), dem Brechungsindex des Eindeckmediums (1.4) und der numerischen Apertur des Objektivs (1.4) berechnet wurde. Es stehen verschiedene Entfaltungsmethoden zur Verfügung, die sich darin unterscheiden, auf welche Weise sie Bildrauschen beim Entfaltungsprozess berücksichtigen. In Versuchsdurchgängen erwies sich die Methode „LeastSqr“ mit 20 Iterationsschritten als optimal. Die entfalteten 3D-Bilder wurden im Tagged Image File Format (TIFF) abgespeichert.

3.4.7. Auswertung der SIM-Aufnahmen

Zur Auswertung der SIM-Aufnahmen war zum Zeitpunkt dieser Arbeit kaum mehr als die Rekonstruktionssoftware von Rainer Heintzmann vorhanden. Für jede Aufnahme musste der Bildstapel in die verschiedenen Kanäle aufgeteilt als einzelne 2D TIFF Dateien gespeichert werden, und zu jedem Kanal mussten zwei angepasste Parameterdateien erstellt werden, die

den genauen Rekonstruktionsprozess steuern. Dieser läuft in 7 Schritten ab, von denen man 3 einzeln per Kommandozeile (Windows Eingabeaufforderung) starten musste – eine sehr mühsame und langsame Arbeitsweise. Die neu implementierten Funktionen automatisieren den gesamten Vorgang nun so weit, dass sich die SIM-Aufnahmen eines kompletten Experiments durch die Ausführung einer einzigen Datei rekonstruieren lassen. Das Experiment kann mehrere Präparate umfassen, zu denen es jeweils mehrere Aufnahmen mit mehreren Kanälen gibt.

Der Ablauf der gesamten Bildverarbeitung vom Rohbildstapel bis zum rekonstruierten und korrigierten Bild ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Am Ende stehen zwei 3D Bilder von jedem Kanal zur Verfügung: ein *Summenbild* mit konventioneller Auflösung und ein *Ergebnisbild* mit verbesserter Auflösung. Das Summenbild entsteht durch bloße Kombination der Phasen-Summenbilder, während das Ergebnisbild aus der vollständigen Rekonstruktion hervorgeht.

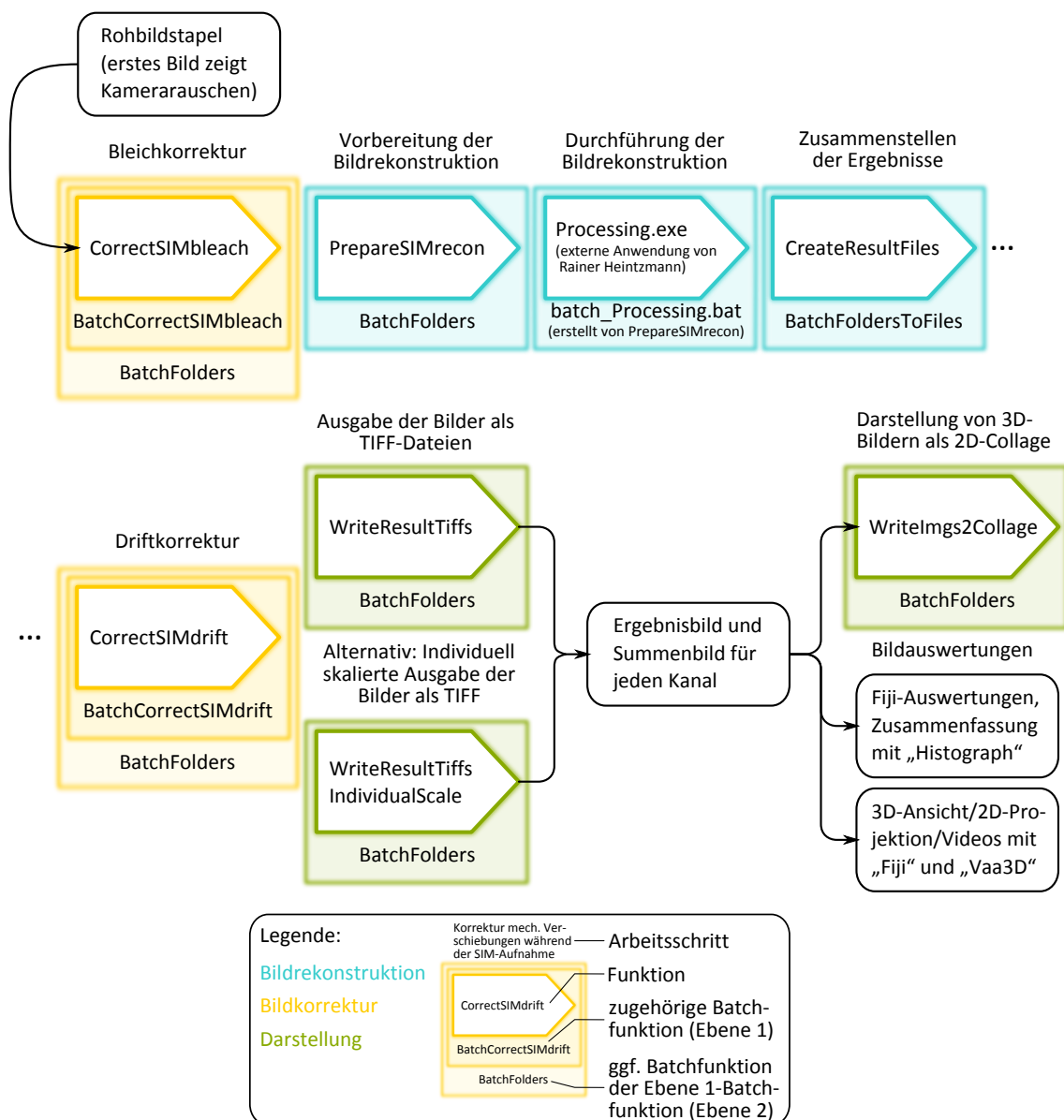


Abbildung 3.13. | Flussdiagramm zur Auswertung von SIM-Aufnahmen. Abgebildet sind die Schritte und MATLAB-Funktionen zur Bildkorrektur, -rekonstruktion und -darstellung.

Neben der Automatisierung der Rekonstruktion wurde viel Wert auf die Bildkorrektur gelegt. Wie in Abb. 3.12c dargestellt, entsprach die pixelweise gebildete Summe der Bilder zu allen Phasenverschiebungen des Beleuchtungsmusters an einer bestimmten Z-Position immer einer Aufnahme mit homogener Beleuchtung. Daher standen zusammengehörige Phasen-Summenbilder für jeden Rotationswinkel des Gitters zur Verfügung, die im Idealfall identisch sein müssten. Unter realen Bedingungen bleichen die Fluorophore jedoch während der Belichtung aus, und es kann zu mechanischen Verschiebungen des Objekts (Drifts) kommen. Beide Effekte können durch Vergleich der zusammengehörigen Phasen-Summenbilder quantifiziert und näherungsweise korrigiert werden. Zur Bleichkorrektur der SIM-Aufnahmen wurde die Funktion `CorrectSIMbleach` implementiert, und zur Driftkorrektur die Funktion `CorrectSIMdrift`.

CorrectSIMbleach verwendet `GetBleachingBtwDirs` zur Bestimmung der Bleichfaktoren (relative Helligkeit) zwischen jedem Phasen-Summenbild und seiner Entsprechung aus der nächsten Gitterrotation (für jeden Kanal getrennt). Für ihre Berechnung wird zunächst von jedem Pixel eines Phasen-Summenbilds ein fester Korrekturwert abgezogen, der dem Kamerarauschen Rechnung trägt (evtl. entstehende negative Werte werden auf 0 gesetzt). Nun wird die Intensitätssumme über alle Pixel gebildet. Die Bleichfaktoren ergeben sich dann gemäß Gleichung (3.1):

$$B(i) = \begin{cases} 1 & | i = 1 \\ \frac{\sum P(i)}{\sum P(i-1)} & | 2 \leq i \leq n \end{cases} \quad \begin{array}{l} B \text{ Bleichfaktor} \\ P \text{ Phasen-Summenbild} \\ i \text{ Bildnummer des Phasen-Summenbilds} \\ n \text{ Anzahl aller Phasen-Summenbilder} \end{array} \quad (3.1)$$

`CorrectSIMbleach` mittelt die Bleichfaktoren zusammengehöriger Phasen-Summenbilder und überprüft die Abweichungen zwischen den Werten aus verschiedenen Z-Positionen. Sind sie konsistent (Abweichung $\leq 10\%$), so werden sie gemäß Formel (3.2) auf die einzelnen Z-Positionen umgelegt. Daraus ergeben sich die Korrekturfaktoren in Gleichung (3.3) für jedes einzelne Phasen-Summenbild. Die Korrektur erfolgt schließlich im hintergrundbereinigten Bildstapel durch Multiplikation mit den Korrekturfaktoren gemäß Gleichung (3.4). Der Korrekturfaktor eines Phasen-Summenbilds wird auf jedes Phasenbild angewandt, aus denen es sich zusammensetzt.

$$B_Z = \sqrt[z]{\bar{B}} \quad \begin{array}{l} B_Z \text{ Bleichfaktor zwischen 2 aufeinanderfolgende Z-Positionen} \\ \bar{B} \text{ mittlerer Bleichfaktor zwischen 2 aufeinanderfolgende Gitterrotationen} \\ z \text{ Anzahl der Z-Positionen} \end{array} \quad (3.2)$$

$$K(i) = B_Z^{-i} \quad \begin{array}{l} K \text{ Korrekturfaktor} \\ i \text{ Index des Phasen-Summenbilds} \end{array} \quad (3.3)$$

$$I_{korr}(i) = K(i) \cdot I(i) \quad \begin{array}{l} I_{korr} \text{ korrigiertes Bild} \\ I \text{ Rohbild} \end{array} \quad (3.4)$$

Abbildung 3.14 veranschaulicht den Effekt der Bleichkorrektur an einer Beispielaufnahme.

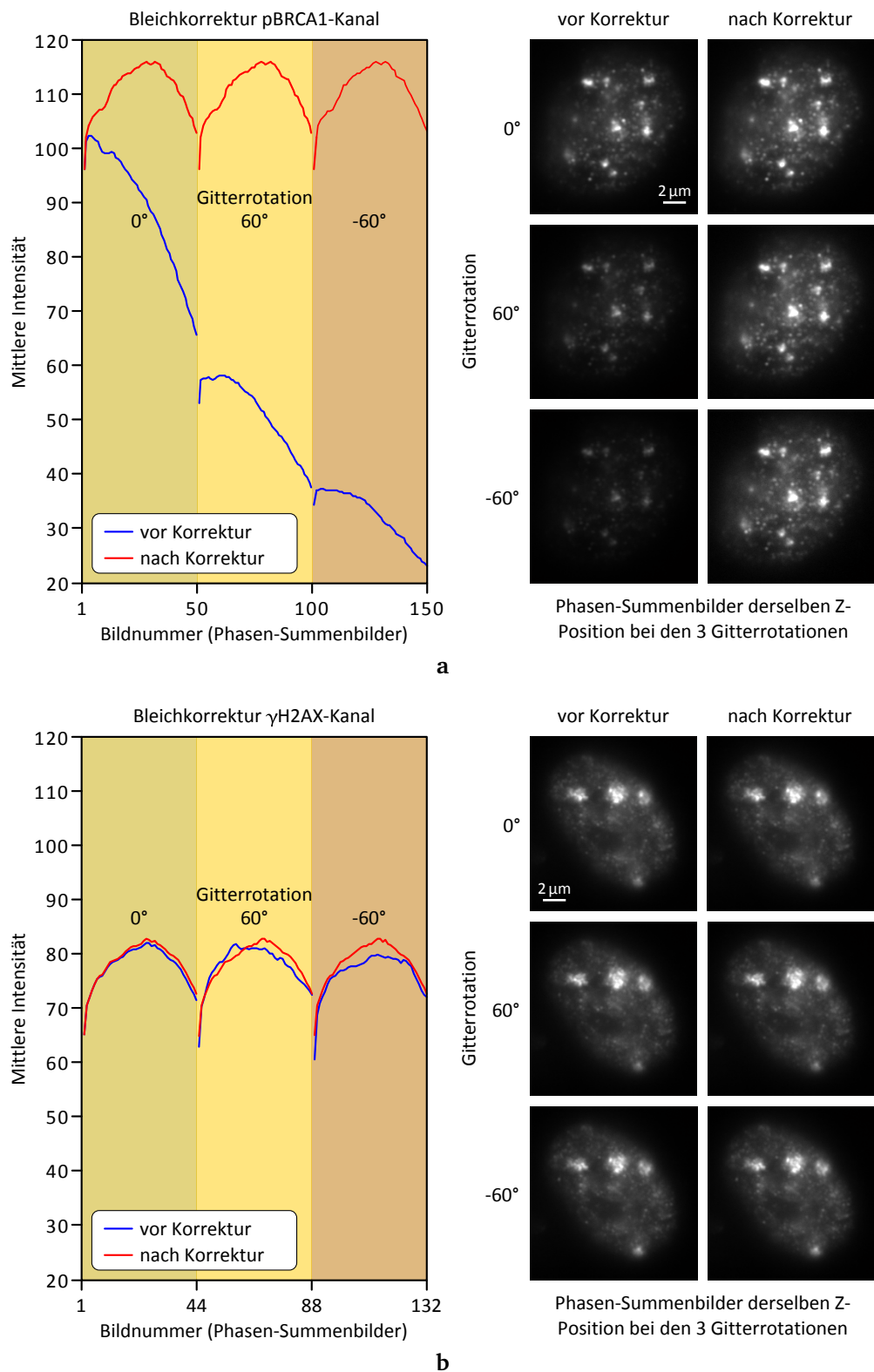


Abbildung 3.14. | Demonstration der Bleichkorrektur für 3D-SIM-Aufnahmen. (a) pBRCA1-Kanal (647 nm Laser). (b) γ H2AX-Kanal (488 nm Laser). **Links:** Mittlere Intensität der Phasen-Summenbilder vor (blau) und nach (rot) der Korrektur mit `CorrectSIMbleach`. **Rechts:** Zugehörige Phasen-Summenbilder an einer ausgewählten Z-Position.

CorrectSIMdrift bestimmt Driftvektoren ausgehend vom Aufnahmebildstapel und benutzt diese zur nachträglichen Korrektur der rekonstruierten Bilder. Die Funktion verwendet `GetDriftBtwDirs` zur Bestimmung linearer Driftvektoren zwischen einem Phasen-Summenbild und seiner Entsprechung aus der nächsten Gitterrotation. Dabei wird lediglich die Z-Position mit der größten Schärfe betrachtet (für jeden Kanal separat), da sich der Versatz dort am genauesten bestimmen lässt. Die schärfste Z-Ebene wird mit `FindSharpestPlane` bestimmt; die Funktion basiert auf einem Bandpassfilter im Fourierraum, der Strukturinformationen von niederfrequenten diffusen Signalen und hochfrequentem Rauschen trennt. Zur sub-Pixel-genauen Bestimmung des X-Y-Versatzes zwischen den zusammengehörigen Phasen-Summenbildern wurde der Optimierungsalgorithmus `findshift` aus dem MATLAB-Paket *DIPimage* verwendet. `CorrectSIMdrift` legt die so erhaltenen Driftvektoren auf die Verschiebungen zwischen den Z-Positionen in den rekonstruierten Bildern um, und korrigiert diese mit Hilfe der *DIPimage*-Funktion `shift`. Die Korrektur wird in Aufnahmereihenfolge für alle Kanäle durchgeführt, wobei der aufsummierte Versatz aller vorangehender Kanäle immer aufgeschlagen wird, so dass die Korrektur auch über mehrere Kanäle hinweg konsistent bleibt. „Überstände“, die aus den Verschiebungen resultieren,¹ werden abgeschnitten.

In Abbildung 3.15 sind die mit `GetDriftBtwDirs` ermittelten Driftvektoren während einer SIM-Aufnahme dargestellt. Die erkennbare Vorzugsrichtung des Probedrifts entlang der Y-Achse war typisch für alle Aufnahmen und rechtfertigte die Annahme linearer Driftgeschwindigkeitsvektoren zur Korrektur der SPDM-Aufnahmen (siehe Abschnitt 3.4.8).

Zur weiteren Auswertung der Ergebnisbilder wurde die Open Source Software *Fiji* [183] benutzt, einer *ImageJ*-Distribution mit speziell ausgewählten Funktionspaketen für biologische Fragestellungen. Konkret wurden γ H2AX- und pBRCA1-Foci mit dem Plugin *3D Object Counter* vermessen, und der Grad der Kolo-kalisation beider Färbungen wurde mit *JACoP* (Just Another Colocalization Plugin) untersucht [184]. Die Erkennung und Segmentierung der einzelnen Foci beruhte auf einem Intensitäts-Grenzwert. Außerdem wurde eine minimale Objektgröße vorgegeben, um Einzelsignale von den eigentlichen Foci zu trennen. Ausgewertet wurden Anzahl, Volumen und Oberfläche der Foci, sowie ihre Sphärizität gemäß Formel (3.5).

$$\Psi = \frac{\pi^{\frac{1}{3}} (6V)^{\frac{2}{3}}}{O} \quad \begin{array}{ll} \Psi & \text{Sphärizität} \\ V & \text{Volumen} \\ O & \text{Oberfläche} \end{array} \quad (3.5)$$

Die Kolo-kalisationsmessungen basierten auf binären Objektmasken, und enthielten somit keine Gewichtung von Intensitätsunterschieden zwischen γ H2AX- und pBRCA1-Foci. Anhand der entfaltenen DAPI-Bilder wurde das Zellkernvolumen und der mit DNA gefüllte Volumenanteil gemessen. Dazu wurde mit Hilfe des Plugins *3D Convex Hull* [185] eine 3-dimensionale konvexe Hülle um den Zellkern berechnet.

Zur 3-dimensionalen Darstellung der Bilder wurde das Plugin *3D Viewer* [186] oder die Software *Vaa3D* [187] verwendet. Dabei konnten die beiden Färbungen, sowie die entfaltenen DAPI-Aufnahmen des Zellkerns (siehe Abschnitt 3.4.6) überlagert und aus verschiedenen

¹tatsächlich entstehen keine echten Überstände, sondern herausragende Pixel werden am gegenüberliegenden Rand in das Bild hineingeschoben und müssen dort entfernt werden.

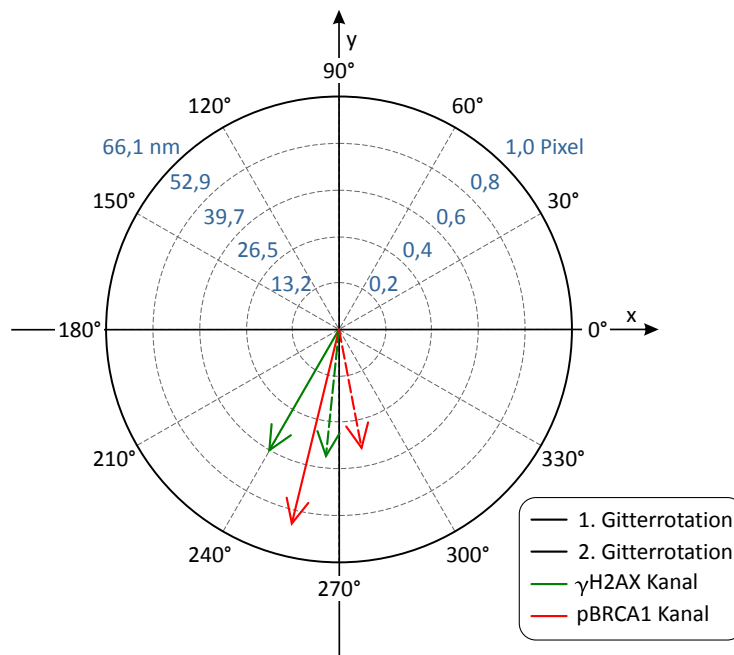


Abbildung 3.15. | Probedrift während einer SIM-Aufnahme. Beispiel der mechanischen Verschiebungen, die während einer SIM-Aufnahme auftraten. Die Vektoren geben den Betrag und die Richtung der Drifts zwischen den Drehungen des Beleuchtungsgitters für den γ H2AX- (grün) und pBRCA1-Kanal (rot) an (Drifts zwischen 1. und 2. Gitterwinkel gestrichelt, zwischen 2. und 3. durchgezogen).

Perspektiven betrachtet werden. Einzelne Ansichten wurden als 2D-Projektionen abgespeichert. Außerdem wurden einige Videos erstellt, in denen die Zellen rotierend dargestellt sind. Für eine weitere Darstellungsform wurde in MATLAB die Funktion `WriteImgs2Collage` implementiert; sie ordnet die Bilder eines 3D-Bildstapels zu einer 2D-Collage um, und ermöglicht damit auf einfache Weise die Abbildung einer Folge optischer Schnitte.

3.4.8. Auswertung der SPDM-Aufnahmen

Für die Lokalisationsdaten existierten bereits Funktionen zur Erfassung der Signalpositionen (Rekonstruktion), für die Bildgebung und die Auswertung der Positionsinformationen unter verschiedenen Gesichtspunkten. Diese Funktionen wurden weitestgehend übernommen, oder nur leicht modifiziert, meist um sie besser automatisieren zu können. Da sie bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurden, wird hier darauf verzichtet.

Zur Lokalisierung der Blinkereignisse in den Rohbildstapeln wurde die bereits vorhandene MATLAB-Funktion `startSPDM` verwendet (leicht modifiziert). Ein Grenzwert legt dabei fest, wie hell ein Blinksignal gegenüber dem Bildhintergrund sein muss, damit es detektiert wird. Um überprüfen zu können, welcher Wert hier sinnvoll ist, wurde die Funktion `ShowLocEventsCL` implementiert. Sie markiert die detektierten Blinkereignisse als rote Pixel im Rohbildstapel, so dass Fehldetektionen unmittelbar ersichtlich werden. Optional können verschiedene Signalcluster (z.B. erhalten mit der weiter unten beschriebenen Funktion `EvaluateFoci`) mit unterschiedlichen Farben markiert werden. Außerdem wurden neue Filterfunktionen (`FilterOrte`, `FilterOrteCol`, `OrteFromImgMask`) entwickelt, mit denen sich die lokalisierten Signale nach verschiedenen Kriterien einschränken lassen.

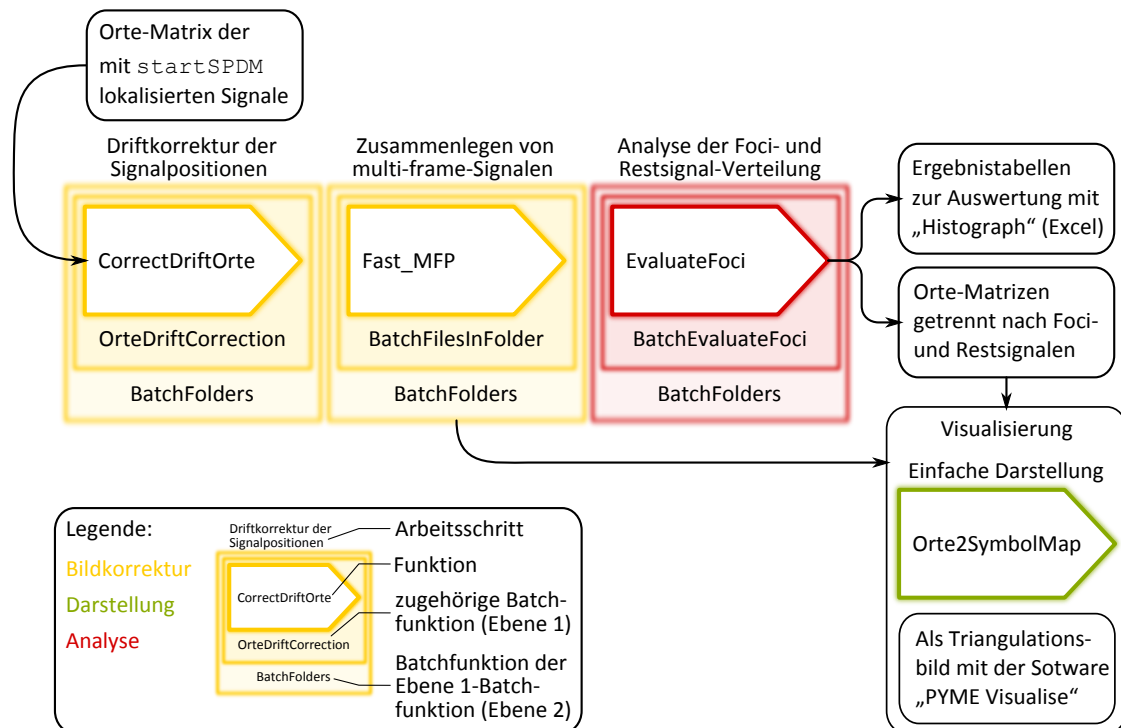


Abbildung 3.16. | Flussdiagramm zur Auswertung von SPDM-Aufnahmen. Abgebildet sind die Schritte und MATLAB-Funktionen zur Bildkorrektur, -analyse und -darstellung, ausgehend von bereits lokalisierten Signalen in Form einer Orte-Matrix.

Nach Prüfung verschiedener Rekonstruktionsvarianten wurde der Grenzwert auf 3.0 festgelegt und kein nachträglicher Filter angewandt.

Das Ergebnis der Lokalisation ist die *Orte-Matrix*. Sie wird als Variable in einer MATLAB-Datei abgelegt, und beinhaltet Informationen zu jedem lokalisiertem Signal (X- und Y-Koordinaten, die Unsicherheiten ihrer Bestimmung, zugehörige Bildnummer im Rohbildstapel...). Mögliche Drifts während der Aufnahme verfälschen die Signalpositionen, deshalb wurden sie mit der neuen Funktion `CorrectDriftOrte` korrigiert (siehe Abb. 3.16). Abbildung 3.17 zeigt den Drift während einer SPDM-Aufnahme. Anhand der Überlagerung der Korrekturbilder vor und nach der Aufnahme, ist die Verschiebung des Zellkerns und der Effekt der Driftkorrektur erkennbar.

CorrectDriftOrte korrigiert die Signalpositionen in einer Orte-Matrix anhand eines Driftgeschwindigkeitsvektors, der aus Korrekturbildern vor und nach der SPDM-Aufnahme ermittelt wird (hier Aufnahmen des Zellkerns im DAPI-Kanal). Mit `findshift` aus dem DIPimage Paket wird der Versatz zwischen den Korrekturbildern bestimmt, und durch den zeitlichen Versatz ihrer Aufnahme geteilt, woraus sich der Driftgeschwindigkeitsvektor ergibt. Multipliziert mit der Zeit zwischen zwei Einzelaufnahmen erhält man den absoluten Drift zwischen ihnen, so dass sich die Signalpositionen in der Orte-Matrix entsprechend der Bildnummer ihrer Detektion korrigieren lassen.

Nach der Driftkorrektur wurden die Orte-Matrizen von *Multi-frame-Signalen* bereinigt. Dabei handelt es sich um Mehrfachdetektion der Signale eines einzelnen Blinkereignisses. Sie kommen durch lang andauernde Fluoreszenzmissionen zu Stande, die auf mehreren Einzelbildern der SPDM-Aufnahme auftauchen, und meist Helligkeitsschwankungen zeigen. Be-

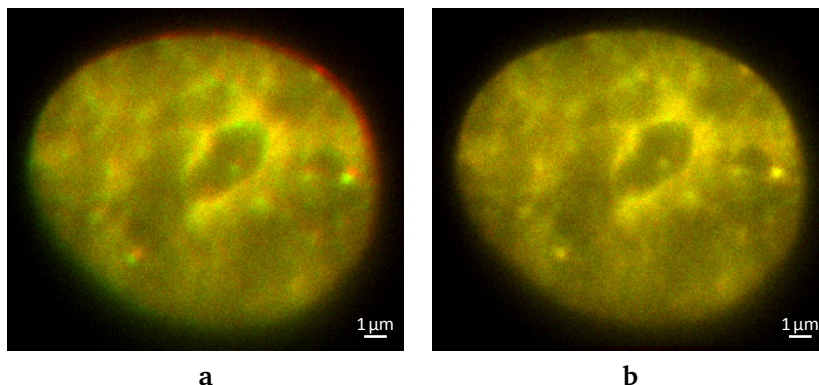


Abbildung 3.17. | Driftkorrektur für Lokisationsaufnahmen. Korrekturbilder eines Zellkerns (DAPI-Kanal) an der selben Z-Position vor (rot) und nach (grün) einer SPDM-Aufnahme (a) vor und (b) nach der Driftkorrektur mit der Funktion `CorrectDriftOrte`.

sonders bei Alexa Fluor 488, dem Fluorophor, das für die γ H2AX-Färbung verwendet wurde, können neben kurzen Lichtblitzen (<50 ms) auch häufig Fluoreszenzemissionen von mehreren 100 ms Dauer beobachtet werden. Zur Bereinigung von Multi-frame-Signalen gab es bereits die Funktion `fast_multiframepoints`. Sie definiert Einträge in der Orte-Matrix als multi-frame-Signale, wenn sie im Aufnahmebildstapel aufeinanderfolgen, und ihr Abstand kleiner ist als die Unsicherheit ihrer Positionsbestimmung. Durch Mittlung der multi-frame-Signale wird eine präzisere Bestimmung der Signalpositionen erreicht. Das kombinierte Ereignis wird in die Orte-Matrix eingetragen, und die Einträge der einzelnen multi-frame-Signale werden entfernt. Um `fast_multiframepoints` für Batchfunktionen kompatibel zu machen, wurde sie durch die neue Funktion `Fast_MFP` ersetzt.

Im nächsten Schritt wurden die korrigierten Orte-Matrizen mit der neu implementierten Funktionen `EvaluateFoci` und `EvaluateSubFoci` ausgewertet:

EvaluateFoci unterteilt die Einträge einer Orte-Matrix in Foci- und Restsignale, und analysiert ihre Signalverteilungen. Zur Unterscheidung beider Gruppen wird eine modifizierte Version der Funktion `Region` von Manuel Gunkel benutzt. Anschließend werden zahlreiche Eigenschaften der einzelnen Foci, aller Foci als Gruppe, und der Restsignale berechnet. Neben der Signalanzahl und dem mittleren Abstand bis zum nächsten Signal, wird z.B. auch die Fläche der Foci, ihre mittlere Signaldichte, ihr Schwerpunkt und der mittlere Abstand zum nächsten Fokus bestimmt. Außerdem wird ein Lokalisationsbild erzeugt, auf dem die Foci als grüne Flächen hervorgehoben sind. `EvaluateFoci` kann mit `BatchEvaluateFoci` erweitert werden, um alle Orte-Dateien eines Ordners zu bearbeiten; darüber hinaus fasst `BatchEvaluateFoci` die Ergebnisse zusammen und speichert sie als Tabelle in Form einer Textdatei ab.

EvaluateSubFoci prüft, ob neben Foci kleinere Signalcluster (Subfoci) in einer Orte-Matrix vorhanden sind. Die Vorgehensweise ist ähnlich wie bei `EvaluateFoci`. Um sicherzustellen, dass es sich bei den Subfoci nicht um zufällige Signalcluster handelt, werden die Ergebnisse mit einer Zufallsverteilung mit gleicher mittlerer Signaldichte verglichen. Analog zu `BatchEvaluateFoci` gibt es für `EvaluateSubFoci` die Erweiterungsfunktion `BatchEvaluateSubFoci`.

Die mit `BatchEvaluateFoci` und `BatchEvaluateSubFoci` erstellten Ergebnistabellen wurden mit dem Erweiterungsmodul für Microsoft Excel *Histogramh* (siehe Abschnitt 3.2.3) weiter ausgewertet und in Form von Diagrammen dargestellt. Bildliche Darstellungen der Orte-Matrizen wurden mit der Funktion `Orte2SymbolMap` und der von David Baddeley entwickelten Software *PYME Visualise* erzeugt. Mit `Orte2SymbolMap` wurden *Positionsbilder* erzeugt, bei denen die Signalpositionen in Form von Punkten oder anderen Symbolen abgebildet werden, während mit *PYME Visualise* [163] *Triangulationsbilder* gerendert wurden (mit der Funktion „Jittered Triangulation“).

Die Triangulationsbilder entstehen durch Verbindung der Signalpositionen zu Dreiecken, deren Helligkeit sich umgekehrt proportional zu ihrer Fläche verhält (je kleiner die Signalabstände, desto heller die Dreiecke). Die Signalpositionen werden mehrfach zufällig innerhalb des Radius ihrer Lokalisationsgenauigkeit verschoben („gejittert“) und die resultierenden Dreiecke werden überlagert.

3.4.9. Überlagerung von SIM und SPDM Bildern

Für die Kombination von 3D-SIM- und 2D-Lokalisationsbildern ist es erforderlich, die zum Lokalisationsbild passende Z-Ebene im SIM-Bild zu finden. Theoretisch lässt sie sich zwar aus den Z-Koordinaten des Objektivs berechnen, die bei der Aufnahme eingestellt wurden; im Allgemeinen wird diese Bestimmung jedoch aufgrund mechanischer Verschiebungen und technischer Toleranzen nur zu einer groben Näherung führen – die Umstellung der Beleuchtungs- und Aufnahmemodi und die Aufnahmen selbst nehmen einige Zeit in Anspruch, während der sich auch geringe Verschiebungen aufsummieren können. Berücksichtigt man zudem einen Drift zwischen den Bildern in X- und Y-Richtung, so ist das Finden der richtigen Z-Position keine triviale Aufgabe. Gelöst wurde sie mit Hilfe der Funktion `CorrectShiftMatchZ`:

CorrectShiftMatchZ verwendet `findshift` aus den `DIPimage` Paket zur Versatz-Bestimmung in X- und Y-Richtung; `findshift` eignet sich zwar prinzipiell auch für eine 3D-Versatz-Bestimmung, jedoch nur bei gleichdimensionalen Bildern.² Deshalb arbeitet `CorrectShiftMatchZ` das SIM-Bild Ebene für Ebene in Z-Richtung ab. Jede Ebene wird mit dem Lokalisationsbild so gut wie möglich zur Deckung gebracht³ und die normierte Abweichung zwischen beiden Bildern wird gemäß Formel (3.6) berechnet. Die SIM-Ebene E_{opt} , die optimal zum Lokalisationsbild passt, wird nun in der Umgebung der Ebene mit der kleinsten normierten Abweichung gesucht. Dabei wird angenommen, dass sich die normierten Abweichungen in der Nähe von E_{opt} proportional zum Abstand von E_{opt} verhalten. Für zwei Ebenen E_o und E_u , die E_{opt} umgeben, entspricht das Verhältnis ihres Abstands zu E_{opt} dann dem Verhältnis ihrer normierten Abweichungen. Die Z-Position von E_{opt} kann daher unabhängig von der normierten Abweichung von E_{opt} nach (3.7) ermittelt werden. Weiterhin ergibt sich E_{opt} durch lineare Interpolation von E_o und E_u gemäß (3.8). Bei idealisierten Bildern stimmt diese Bestimmung exakt, bei realen Bildern jedoch nur näherungsweise, da

²Es ist zwar möglich das Lokalisationsbild in Z-Richtung mit schwarzen Bildern aufzustocken, um es an die Dimensionalität des SIM-Bilds anzugleichen, jedoch führt dies zu falschen Ergebnissen, da der abrupte Übergang vom Lokalisationsbild zu den Füllbildern die Bestimmung stark beeinflusst.

³unter Verwendung von `CorrectShiftEqualDims`. Dabei wird der X- und Y-Versatz mit `findshift` bestimmt, mit `shift` korrigiert, und resultierende „Überstände“ werden abgeschnitten.

die normierten Abweichungen von Bildrauschen beeinflusst werden. Deshalb interpoliert `CorrectShiftMatchZ` Zwischenbildebene um E_{opt} herum und wiederholt die Optimierung (rekursiv) mit dem interpolierten Bildstapel, bis eine ausreichende Genauigkeit erreicht wird (Änderung der optimierten Z-Position $< 1\%$, maximal 3 Rekursionen). Schließlich gibt `CorrectShiftMatchZ` das Lokalisationsbild und die am besten dazu passende SIM-Bildebene nach der Driftkorrektur zurück, sowie den entsprechenden 2D-Versatzvektor und die übereinstimmende Z-Position im SIM-Bild.

$$A(i) = \frac{1}{n^*} \sum_{p=1}^{n^*} |L^* - S_i^*|$$

A	Normierte Abweichung	
i	Index der Z-Ebene im SIM-Bild	
n	Pixelanzahl	(3.6)
$*$	nach Anwendung von <code>CorrectShiftEqualDims</code>	
p	Pixelindex	
L	Lokalisationsbild	
S_i	SIM-Bildebene am Z-Index i	

$$AV = \frac{A(E_o)}{A(E_u)} = \frac{r_o}{r_u} = \frac{z_{opt} - z_o}{z_u - z_{opt}}$$

$$\Rightarrow z_{opt} = \frac{z_o \cdot AV + z_u}{AV + 1}$$

AV	Abweichungs-Verhältnis	(3.7)
E_o	Ebene oberhalb von E_{opt}	
E_u	Ebene unterhalb von E_{opt}	
E_{opt}	optimal übereinstimmende Ebene	
r_o	Abstand von E_o zu E_{opt}	
r_u	Abstand von E_u zu E_{opt}	
z_o	Z-Position von E_o	(3.8)
z_u	Z-Position von E_u	
z_{opt}	Z-Position der optimal übereinstimmenden Ebene	

$$E_{opt} = E_o \frac{r_u}{r_o + r_u} + E_u \frac{r_o}{r_o + r_u}$$

$$\Rightarrow E_{opt} = \frac{E_o + E_u \cdot AV}{AV + 1}$$

Prinzipiell eignen sich alle auf `findshift` basierten Funktionen gut zur Versatz-Bestimmung zwischen zwei Bildern, sofern diese die gleichen Strukturen abbilden; da es aber viele Möglichkeiten zur Visualisierung der Lokalisationsdaten gibt, stellte sich die Frage, welche Darstellungsform sich am besten für die Versatz-Bestimmung gegenüber dem SIM-Bild eignet. Bei Punkt-basierten Abbildungen werden die Signalpositionen mit hellen Pixeln in das Bild eingetragen (ggf. Gauß-förmig verschmiert entsprechend der Lokalisationsgenauigkeit), oder in Form einfacher Symbole. Das ermöglicht zwar „Einzelmolekül-Auflösung“, gewichtet jedoch die Helligkeit von Regionen sehr geringer Signaldichte viel stärker, als dies bei den SIM-Bildern der Fall ist (und bei allen anderen Aufnahmen, die auf dem klassischen Fluoreszenzprinzip beruhen). Im Gegensatz dazu hängt die Helligkeit bei Flächen-basierten Abbildungen, wie der Triangulationsmethode, direkt von der Signaldichte ab. Triangulationsbilder eignen sich daher besonders gut für die Versatz-Bestimmung. Der erhaltene Versatzvektor kann anschließend benutzt werden, um die Signalpositionen in der Orte-Matrix zu korrigieren, so dass sich auch Punkt-basierte Lokalisationsbilder erstellen lassen, die sich optimal mit der gefundenen SIM-Bildebene decken. Die Funktion `CombineSIMspdm` benutzt `CorrectShiftMatchZ`, um diese Aufgabe zu erfüllen. Außerdem erstellt sie verschiedene Überlagerungsbilder aus der Punkt-Darstellung, dem Triangulationsbild, der rekonstruierten SIM-Bildebene und ihrem entsprechenden Summenbild mit konventioneller Auflösung.

3.4.10. Ergebnisse aus methodischer Sicht

Abbildung 3.18 zeigt anhand einer Beispielaufnahme die Auflösungsverbesserung durch SIM im Vergleich zu konventioneller Weitfeldmikroskopie. Die γ H2AX und pBRCA1 Foci sind klar und deutlich im SIM-Bild zu erkennen, und erscheinen deutlich schärfer als in der Weitfeldaufnahme mit konventioneller Auflösung. Vor allem die durch SIM erreichte Unterdrückung von Streulicht außerhalb der Fokusebene verbesserte die Bildqualität erheblich und erlaubte eine wesentlich genauere Abgrenzung zwischen verschiedenen γ H2AX und pBRCA1 Foci.

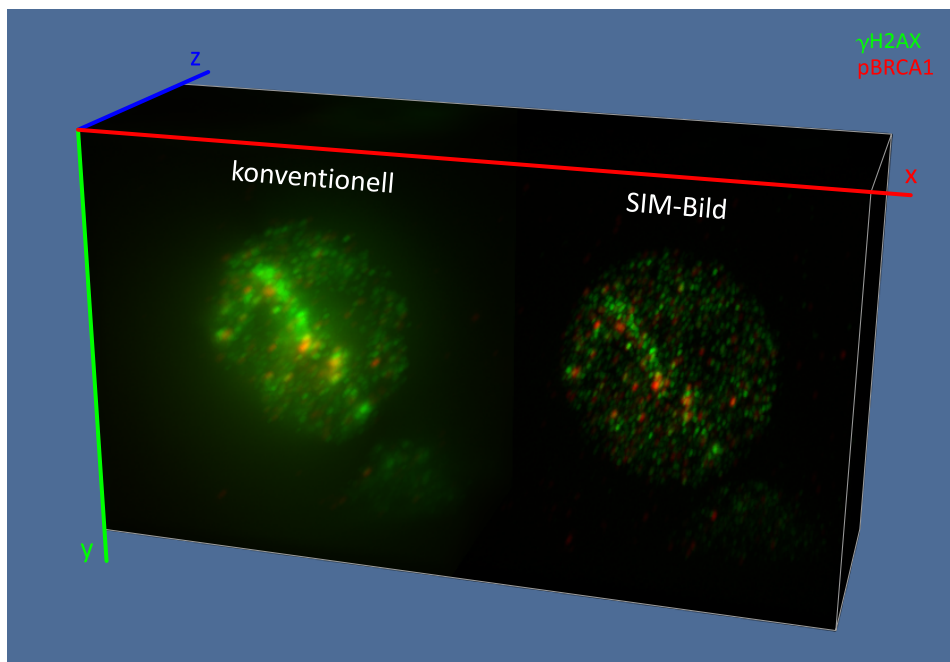


Abbildung 3.18. | Auflösungsverbesserung durch 3D-SIM. Links: Weitfeldbild mit konventioneller Auflösung, Rechts: SIM-Bild. Die Aufnahmen zeigen γ H2AX (grün) und pBRCA1 (rot) innerhalb des Zellkerns einer U87 Zelle 30 min nach Schrägbestrahlung mit einem einzelnen ^{12}C -Ion.

Im Vergleich zu den SIM-Bildern konnte durch SPDM eine noch stärkere Auflösungsverbesserung in 2D erreicht werden. Die durch Einzelmoleküldetektion erhaltenen Positionen der γ H2AX-gebundenen Antikörper wurden direkt als Punkte visualisiert (Abb. 3.19c,g), oder mit Hilfe der Triangulationsmethode (Abb. 3.19d,h).

Die Überlagerung der Lokalisationsbilder mit der entsprechenden Ebene im SIM-Bild (Abb. 3.19i,j) ergab eine exzellente Übereinstimmung zwischen beiden Aufnahmen. Nur unscharfe Signale im SIM-Bild, die nicht exakt in der Fokusebene lagen, fehlten in den Triangulationsbildern, wodurch sich die bessere axiale Auflösung von SPDM bemerkbar machte. Trotz der fundamental unterschiedlichen Fluoreszenz- und Detektionsprinzipien von SIM und SPDM, waren dieselben Strukturen erkennbar. Verfälschungen durch Rekonstruktionsartefakte konnten somit ausgeschlossen werden.

In den SPDM Punktbildern gab es einige Signale, die weder in den Triangulationsbildern, noch den SIM-Bildern zu sehen waren. Dabei handelte es sich um isoliert liegende Signale, die typischerweise einen mittleren Abstand zu den nächsten 8 Nachbarsignalen von mehr als 300 nm aufwiesen. Diese Signale belegten, dass sich mit SPDM Einzelmoleküle detektieren lassen, die durch Bildgebung, die auf dem konventionellen Fluoreszenzprinzip basiert (einschließlich SIM), nicht erfassbar sind. Bei konventioneller Fluoreszenzemission sind isolierte

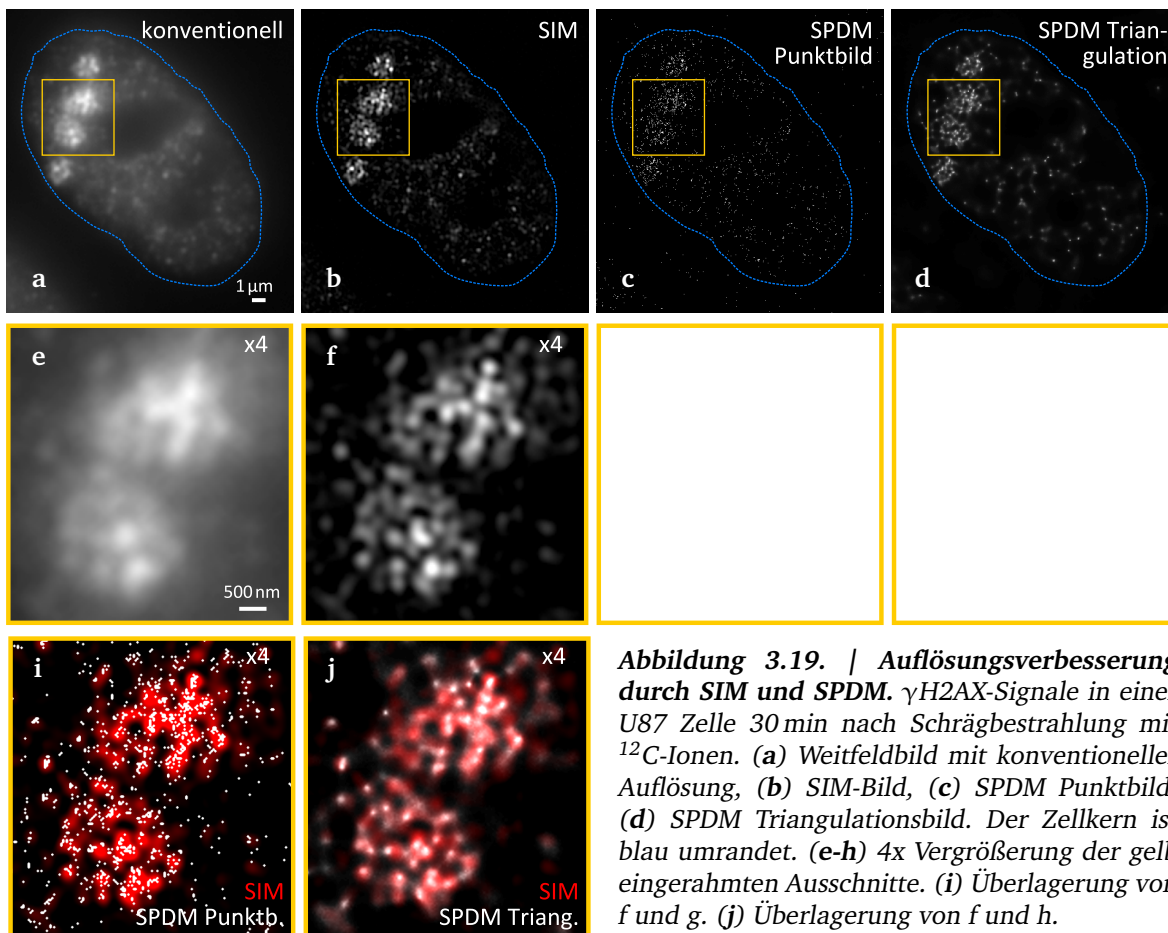


Abbildung 3.19. | Auflösungverbesserung durch SIM und SPDM. γ H2AX-Signale in einer U87 Zelle 30 min nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen. (a) Weitfeldbild mit konventioneller Auflösung, (b) SIM-Bild, (c) SPDM Punktbild, (d) SPDM Triangulationsbild. Der Zellkern ist blau umrandet. (e-h) 4x Vergrößerung der gelb eingerahmten Ausschnitte. (i) Überlagerung von f und g. (j) Überlagerung von f und h.

Einzelnsignale zu schwach um detektiert zu werden; erst bei dichter Markierung mit vielen Fluorophoren wird eine Struktur sichtbar. Die SPDM-Visualisierung mit Hilfe der Triangulationsmethode gewichtet die Intensität einer Struktur mit der Fluorophordichte, ähnlich wie bei gewöhnlicher Mikroskopie. Aus diesem Grund verschwinden isolierte Einzelsignale, die keinen Beitrag zur Strukturauflösung liefern. Die Triangulationsmethode bot einen guten Kompromiss zwischen einer „natürlichen“ Strukturwiedergabe und der erheblichen Auflösungsverbesserung aufgrund der Einzelmoleküldetektion. Folglich eignet sich diese Darstellungsform in besonderer Weise zum Vergleich von SPDM-Aufnahmen mit Bildern, die nicht durch Lokalisationsmikroskopie erstellt wurden.

Die Ergebnisse zeigten, dass SIM und SPDM in der Lage sind, Feinstrukturen innerhalb der γ H2AX Foci aufzulösen, die mit konventioneller Mikroskopie nur unzureichend erkennbar sind. Die Kombination von SIM und SPDM erwies sich zudem als vorteilhaft, weil sie die Stärken beider Methoden verbindet: SIM eignet sich sehr gut für 3D-Aufnahmen und Mehrfachfärbungen mit verschiedenen Fluorophoren, und wurde deshalb zur Vermessung der äußeren Gestalt der γ H2AX- und pBRCA1 Foci ihrer Kolo-kalisation verwendet, während die besonders hohe Auflösung von SPDM und die Kenntnis der Einzelmolekülpositionen eine besonders genaue Analyse der Feinstruktur von γ H2AX Foci erlaubte (siehe Abschnitt 4.3).

4.1. Dosis-Wirkung von ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung

U87 Zellen wurden entweder am Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT) mit ^{12}C -Ionen, oder an einem konventionellen Linearbeschleuniger (LinAc) zur Erzeugung von 6 MV Photonen am DKFZ bestrahlt. Um die Dosis-Wirkung zu vergleichen wurde zunächst das klonogene Überleben getestet (siehe Abb. 4.1). Für die ^{12}C -Ionen-Strahlung ergab sich eine relative biologische Wirksamkeit von 3,00 bei 50% Überleben (RBW_{50}) und 2,64 bei 10% Überleben (RBW_{10}).

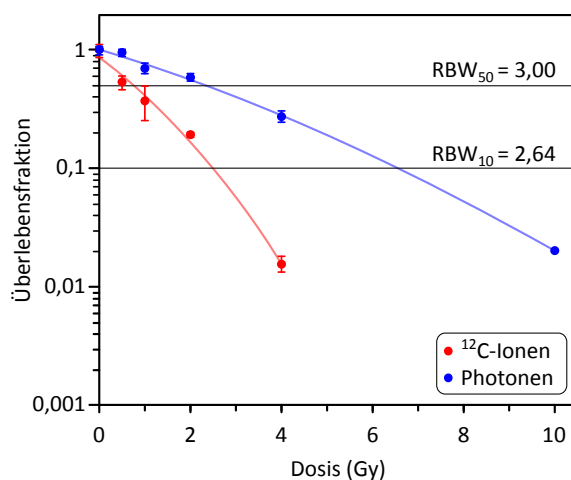


Abbildung 4.1. | Klonogenes Überleben. Überlebensfraktion von U87 Zellen nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (rot) oder Photonen (blau) in Abhängigkeit von der Dosis (Fits nach linear-quadratischem Modell). Die relative biologische Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen bei 50% (RBW_{50}) und 10% (RBW_{10}) Überleben sind eingetragen.

Anschließend wurde untersucht, wie gut die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) mit dem klonogenen Überleben korreliert und welchen Einfluss die Zellzyklusphase dabei spielt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,5 – 8 Gy bestrahlt und der DSB-Marker γH2AX nach 30 min Inkubationszeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) und mikroskopisch untersucht.

4.1.1. Die relative Wirksamkeit von ^{12}C -Ionen variiert mit der Zellzyklusphase und der Dosis

Abbildung 4.2 zeigt die Ergebnisse der FACS-Messungen für die einzelnen Zellzyklusphasen und in der gesamten Zellpopulation. Zum Vergleich des Schadens in den verschiedenen Zellzyklusphasen, wurde die γH2AX -Fluoreszenz auf den jeweiligen DNA-Gehalt normiert. Sowohl in der Gesamtpopulation, als auch in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde für beide Strahlenarten ein linearer Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung beobachtet, der

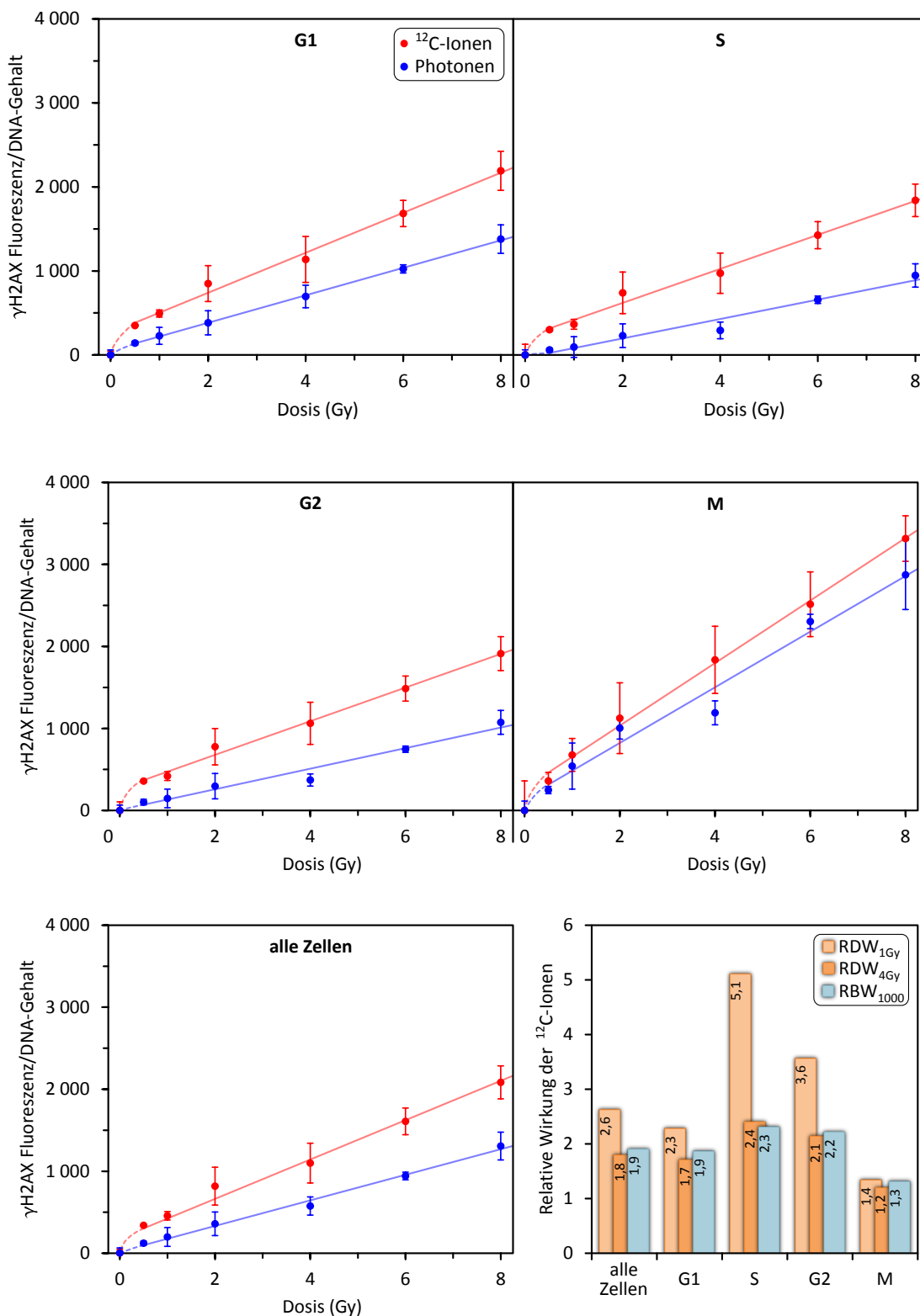


Abbildung 4.2. | Dosis-Wirkung von Photonen und ¹²C-Ionen: Zellzykluspezifische γ H2AX-Messung (FACS). Mediane γ H2AX-Fluoreszenzintensität nach Nullpunktkorrektur in U87 Zellen 30 min nach Bestrahlung mit Photonen (blau) oder ¹²C-Ionen (rot). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate, sowie zugehörige Regressionsgeraden. Die Werte wurden auf den DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen normiert (G1: 2N, S: 3N, G2 und M: 4N, mit N=einfacher Chromosomensatz). **Unten rechts:** Relative Wirkung der ¹²C-Ionen (RDW_{1Gy}, RDW_{4Gy} und RBW₁₀₀₀), basierend auf den Regressionsgeraden.

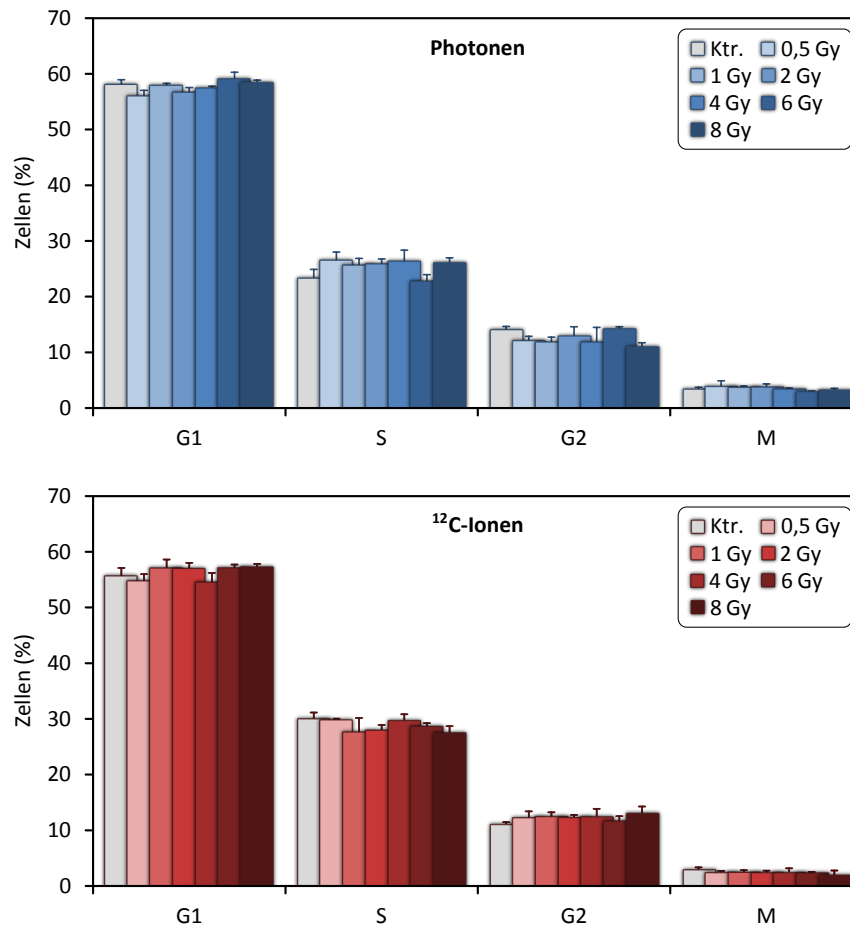


Abbildung 4.3. | Zellzyklusanalyse 30 min nach Bestrahlung mit Photonen oder ¹²C-Ionen (FACS-Messung). Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen an der gesamten U87 Zellpopulation bei verschiedenen Strahlendosen (Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate).

sich mit Hilfe von Regressionsgeraden beschreiben ließ. Bei ¹²C-Ionen-Strahlung trat zwischen 0 und 0,5 Gy ein Sprung auf, der auf eine überproportional große Wirkung bei kleinen Dosen hinwies. Gemessen an der Steigung der Regressionsgeraden reagierten die Zellen bei gleicher Strahlenart ähnlich in der S- und G2-Phase, etwas stärker in der G1-Phase und besonders empfindlich in der M-Phase.

Insgesamt wirkten ¹²C-Ionen bei gleicher Dosis stärker als Photonen. Zum Vergleich wurde anhand der Regressionsgeraden die relative dosisäquivalente Wirksamkeit (RDW) der ¹²C-Ionen bei 1 Gy (RDW_{1Gy}) und 4 Gy (RDW_{4Gy}) und die relative biologische Wirksamkeit bei einer normierten Fluoreszenzintensität von 1000 (RBW₁₀₀₀) ermittelt (siehe Säulendiagramm in Abbildung 4.2). Generell war die relative Wirksamkeit bei 1 Gy größer als bei 4 Gy. Dieses Phänomen konnte auch bei den Dosis-Wirkungs-Kurven des klonogenen Zellüberlebens (Abb. 4.1) beobachtet werden und geht auf die strahlenspezifischen Unterschiede in der Kurvenform bei geringen Dosen (hier <0,5 Gy) zurück.

Für die gesamte Zellpopulation betrug die RDW_{1Gy} 2,6 und die RDW_{4Gy} 1,8. Die höchsten Werte traten in der S-Phase auf, und hier war die RDW_{1Gy} mehr als doppelt so groß wie die RDW_{4Gy} (5,1 gegenüber 2,4). In der M-Phase wirkten ¹²C-Ionen nur geringfügig stärker als

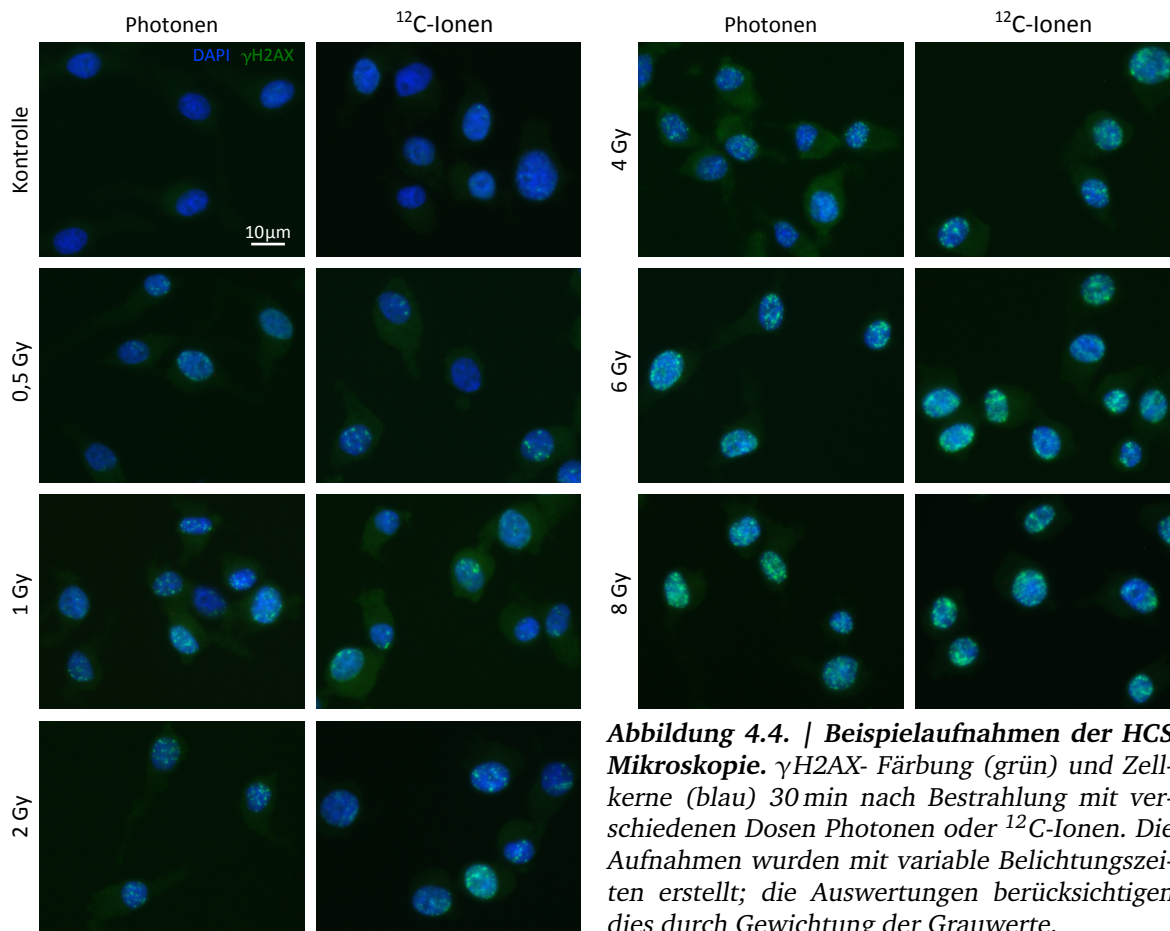


Abbildung 4.4. | Beispielaufnahmen der HCS Mikroskopie. γ H2AX- Färbung (grün) und Zellkerne (blau) 30 min nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen Photonen oder ^{12}C -Ionen. Die Aufnahmen wurden mit variable Belichtungszeiten erstellt; die Auswertungen berücksichtigen dies durch Gewichtung der Grauwerte.

Photonen gleicher Dosis und es gab den geringsten Unterschied zwischen $\text{RDW}_{1\text{Gy}}$ (1,4) und $\text{RDW}_{4\text{Gy}}$ (1,2). Die RBW_{1000} stimmte gut mit der $\text{RDW}_{4\text{Gy}}$ überein.

Die Bestrahlung hatte nach der kurzen Inkubationszeit von 30 min keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Zellen (siehe Abb. 4.3), so dass die Ergebnisse die Primärwirkung der Strahlung unverfälscht widerspiegeln.

4.1.2. ^{12}C -Ionen und Photonen verursachen qualitativ unterschiedliche DSB-Foci

Um ein genaueres Bild von den Vorgängen innerhalb der Zellen nach Bestrahlung zu erhalten, wurde die γ H2AX-Verteilung im Zellkern mit Hilfe der High content screening (HCS) Mikroskopie untersucht (automatische Aufnahme und Analyse einer Vielzahl von Messparametern auf Einzelzellniveau). Abbildung 4.4 zeigt repräsentative Aufnahmen der Präparate. Die Messergebnisse sind in Abbildung 4.5 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit den FACS-Ergebnissen für alle Zellen stieg die mikroskopisch ermittelte mittlere Intensität des γ H2AX-Signals linear mit der Strahlendosis an und wies für ^{12}C -Ionen eine größere Steigung auf als für Photonen (Abb. 4.5b). Im Gegensatz dazu verlief die Anzahl der γ H2AX Foci (Abb. 4.5a) nur bis ca. 2 Gy linear, darüber entsprach der Verlauf eher einer Exponentialfunktion, die sich einem oberen Grenzwert annähert.

Für Photonen lag der Grenzwert bei $30,5 \pm 1,0$ Foci pro Zelle, für ^{12}C -Ionen bei $22,5 \pm 1,8$. Generell wurden bei ^{12}C -Ionen-Bestrahlung weniger Foci gemessen als bei gleicher Photone dosis. Die mittlere Fläche ^{12}C -Ionen-induzierter Foci war jedoch im Durchschnitt 30%

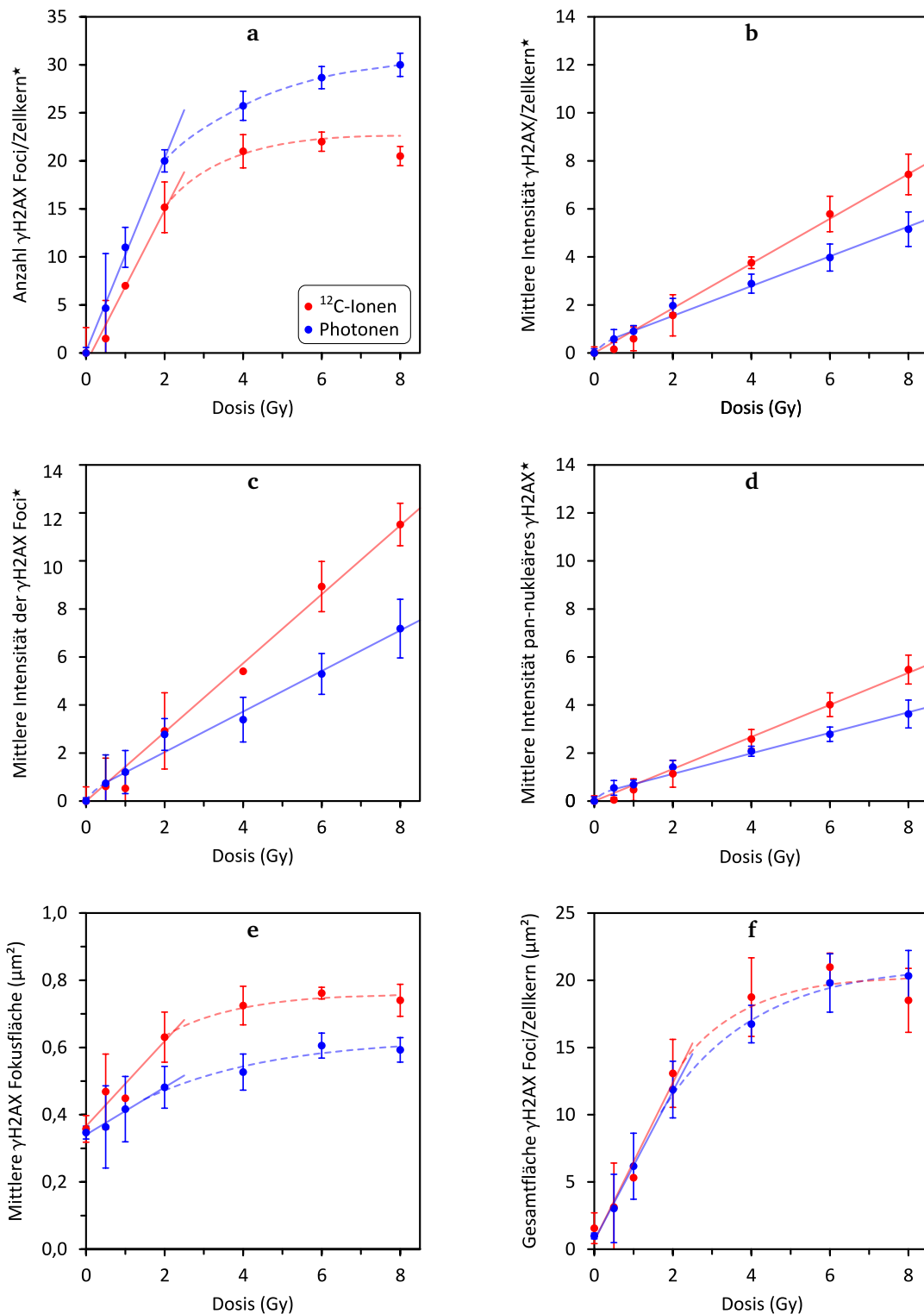


Abbildung 4.5. | Dosis-abhängige Eigenschaften der γ H2AX-Färbung 30 min nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen (HCS Mikroskopie). (a) γ H2AX Foci pro Zellkern. (b) mittlere Intensität im Zellkern, (c) innerhalb der Foci und (d) außerhalb der Foci (pan-nukleär). (e) mittlere γ H2AX Fokusfläche. (f) Gesamtfläche der γ H2AX Foci pro Zellkern. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate, sowie zugehörige Regressionsgeraden (durchgezogene Linien) bzw. exponentielle Trends der Form $f(x) = y_{\text{max}} + We^{-\frac{x}{\lambda}}$ (gestrichelt). *Nullpunkt-korrigierte Werte.

größer (Abb. 4.5e) und dadurch ergaben sich für die Gesamtflächen aller Foci pro Zellkern (Abb. 4.5f) gleiche Werte für beide Strahlenarten.

Wie bei der Fokusanzahl zeigte sich auch bei der mittleren und gesamten Fokusfläche eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die einer exponentiellen Annäherungsfunktion folgte, und sich nur unterhalb von 2 Gy hinreichend durch eine Gerade beschreiben ließ. Der Grenzwert der mittleren Fokusfläche lag für Photonen bei $0,62 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ und für ^{12}C -Ionen bei $0,76 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$. Der Grenzwert für die Gesamtfläche lag in beiden Fällen bei ca. $21 \mu\text{m}^2$ und betrug damit etwa 30% der durchschnittlichen Zellkernfläche.

Es stellte sich die Frage, ob die beobachteten Sättigungseffekte biologisch bedingt waren, oder ob sie messtechnische Limitationen aufzeigten, weil einzelne Foci nicht mehr voneinander unterschieden werden können, sobald ihr Abstand die optische Auflösungsgrenze unterschreitet. Das Erreichen von Messgrenzen sollte sich durch Auffälligkeiten in der Messwertverteilung verraten. Deshalb wurden die Messwertverteilungen der Fokusanzahl und der mittleren Fokusfläche näher betrachtet, indem die kumulative relative Häufigkeit der Messwerte als Histogramme dargestellt wurden. Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse für die Fokusanzahl und Abbildung 4.7 für die mittlere Fokusfläche.

In beiden Fällen ergaben sich Verläufe mit ähnlicher Charakteristik: bei 6 Gy lagen ausgeprägt sigmoidale Kurven vor, während die Kurven bei 1 Gy im unteren Teil weniger stark gekrümmt waren. Dennoch ergaben sich im Dosisvergleich bei gleicher Strahlenart sehr ähnliche Steigungen im annähernd linearen Mittelteil der Kurven. Dieses Verhalten ist typisch für Prozesse, die der Poisson-Verteilung unterliegen und ist für die Erzeugung von DSBs durch Strahlung zu erwarten. Verräterische Knickpunkte und starke Änderungen der Steigung im Mittelteil der Kurven, die stark auf das Überschreiten von Messgrenzen hindeuten, wurden nicht gefunden. Trotz des nicht-linearen Verhaltens der Fokusanzahl und -fläche oberhalb von 2 Gy entwickelte sich die mittlere Intensität innerhalb der Foci im gesamten Messbereich

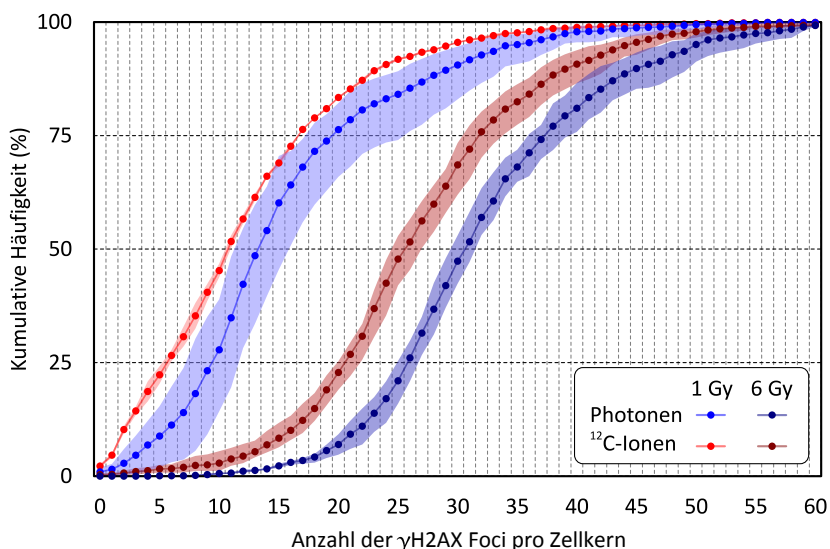


Abbildung 4.6. | Verteilung der γH2AX Fokusanzahl/Zellkern bei gleicher Dosis Photonen oder ^{12}C -Ionen. Zur Darstellung der Verteilungen wurden die kumulativen relativen Häufigkeiten der Messwerte berechnet. Die Histogramme zeigen die Mittelwerte der Replikate (durch Linien verbundene Datenpunkte), sowie die größten Abweichungen nach oben und unten (hinterlegte Flächen) für Photonen- (Blautöne) und ^{12}C -Ionen-Strahlung (Rottöne) bei einer Dosis von 1 Gy im Vergleich zu 6 Gy. Die Linien zwischen den Datenpunkten dienen als optische Hilfen und stellen keine Fits dar.

proportional zur Dosis (Abb. 4.5c), wobei die Steigung bei ^{12}C -Ionen größer war als bei Photonen. Überraschenderweise zeigte sich in den Bereichen außerhalb der Foci (*pan-nukleär*) ebenfalls eine zur Dosis proportionale Zunahme der mittleren γH2AX -Fluoreszenzintensität (Abb. 4.5d).

Um festzustellen, ob es sich bei dem pan-nukleären γH2AX um ein biologisches Phänomen oder nur um ein Messartefakt durch Streulicht aus den Foci handelte, wurden weitere Experimente durchgeführt. Da der dosisabhängige Anstieg des pan-nukleären Signals bei ^{12}C -Ionen größer war als bei Photonen, wurde bei diesen Versuchen nur mit ^{12}C -Ionen bestrahlt. Die Zellen wurden ausschließlich mikroskopisch untersucht und daher direkt auf Deckgläsern bestrahlt. Dies ermöglichte die Herstellung von Proben, die sich auch für supraauflösende Mikroskopie eigneten. Die Morphologie der Zellen blieb erhalten, Beeinträchtigungen durch das Ablösen der Zellen vom Untergrund, wie es für die FACS-Messungen erforderlich war, konnten ausgeschlossen werden. Eine weitere Konsequenz der unterschiedlichen Präparation war, dass die Zellen ausschließlich aus der Perspektive der Bestrahlungsrichtung (von oben) betrachtet werden konnten. Eine Verfolgung der Ionenflugbahn von der Seite war somit nicht möglich, jedoch wurde die Beurteilung von pan-nukleärem γH2AX erleichtert.

Die Auswertung mit dem HCS Mikroskop bestätigte die vorherigen Ergebnisse, nach denen die Anzahl der γH2AX Foci und die Focifläche unterhalb von 2 Gy linear mit der Dosis anstiegen und oberhalb davon in Sättigung gingen, obwohl sich die mittlere Intensität des γH2AX -Signals im gesamten Zellkern über den gesamten Messbereich hinweg proportional zur Dosis entwickelte (siehe Abb. 4.8).

Eine nähere Betrachtung der Messwertverteilungen zu der Fokusanzahl zeigte erwartungsgemäß das Verhalten einer Poisson-Verteilung, die bei kleinen Werten im Fall der unbestrahlten Kontrollen rechtsschief verlief und mit zunehmender Fokusanzahl, bzw. höherer Dosis immer symmetrischer wurde. Abbildung 4.9 zeigt dies anhand der kumulierten relativen

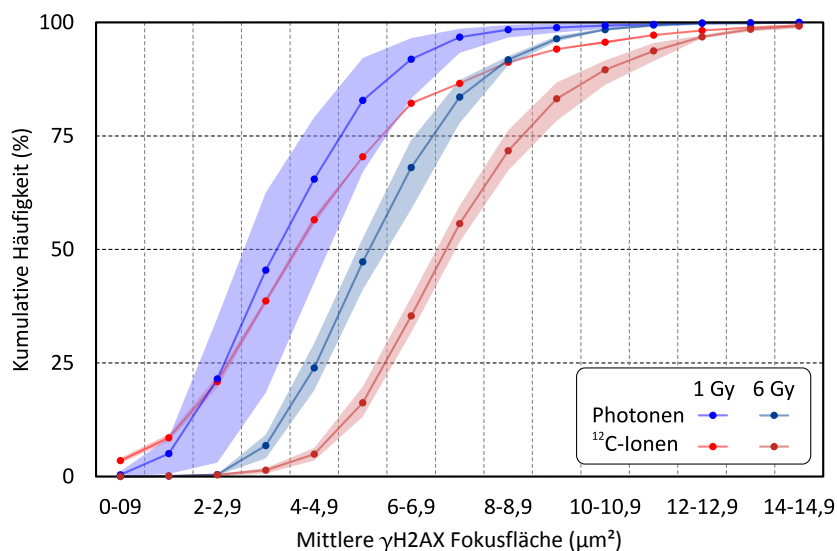


Abbildung 4.7. | Verteilung der mittleren γH2AX Fokussfläche bei gleicher Dosis Photonen oder ^{12}C -Ionen (HCS Mikroskopie). Zur Darstellung der Verteilungen wurden die kumulativen relativen Häufigkeiten der Messwerte berechnet. Die Histogramme zeigen die Mittelwerte der Replikate (Datenpunkte), sowie die größten Abweichungen nach oben und unten (hinterlegte Flächen) für Photonen (Blautöne) und ^{12}C -Ionen-Strahlung (Rottöne) bei einer Dosis von 1 Gy im Vergleich zu 6 Gy. Die Linien zwischen den Datenpunkten dienen als optische Hilfen und stellen keine Fits dar.

Häufigkeiten der Fokuszahlen (Übergang von einem exponentiellen in einen sigmoidalen Verlauf). Es ist gut erkennbar, dass die Kurven unterhalb von 2 Gy eine zur Dosis proportionale Verschiebung nach rechts (höhere Fokusanzahl) aufweisen und oberhalb von 2 Gy kleinere bis keine Verschiebungen mehr auftreten. Die generelle Form der Kurven zeigte wieder keine Anzeichen für die Überschreitung von Messgrenzen.

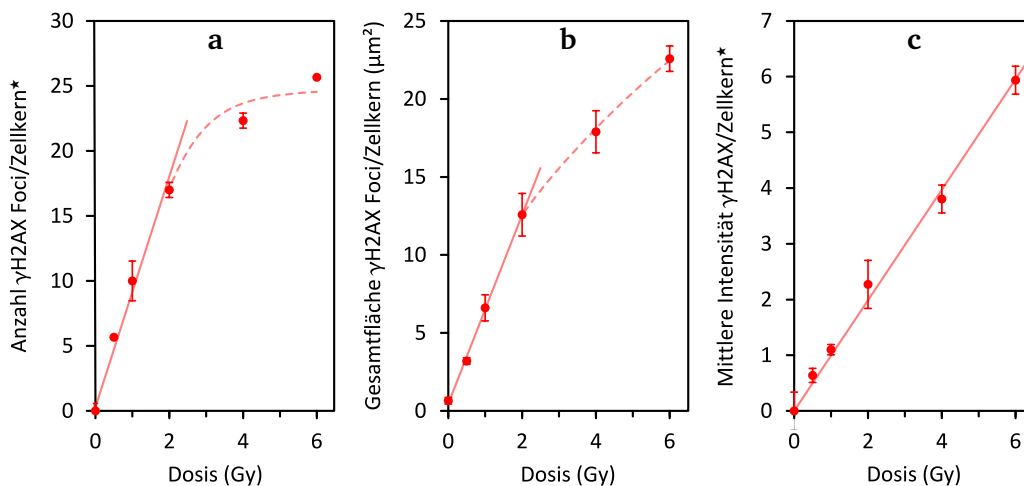


Abbildung 4.8. | Dosis-abhängige Eigenschaften der γ H2AX-Färbung 30 min nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (HCS Mikroskopie). (a) Anzahl und (b) Gesamtfläche der γ H2AX Foci pro Zellkern. (c) mittlere Intensität im Zellkern. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate, sowie zugehörige Regressionsgeraden (durchgezogene Linien) bzw. exponentielle Trends (gestrichelt). *Nullpunkt-korrigierte Werte.

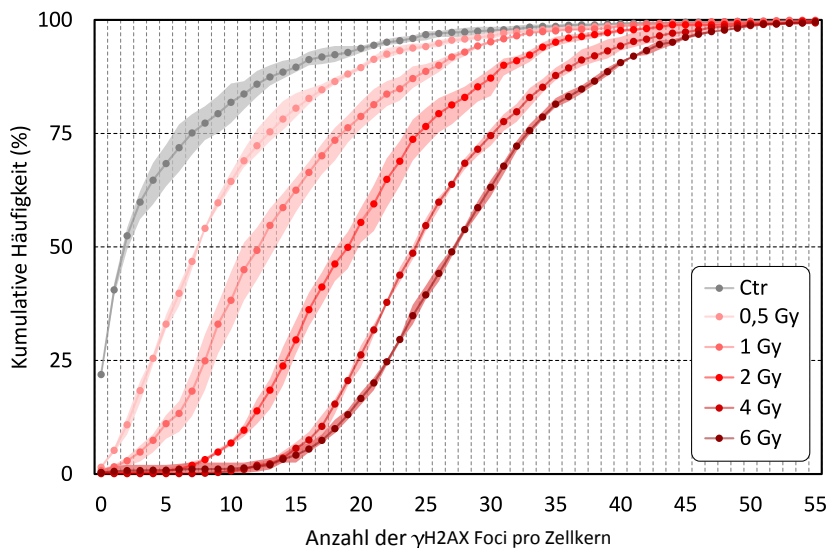


Abbildung 4.9. | Dosis-abhängige Verteilung der Anzahl an γ H2AX Foci pro Zellkern nach ^{12}C -Ionen-Bestrahlung (HCS Mikroskopie). Zur Darstellung der Verteilungen wurden die kumulativen relativen Häufigkeiten der Messwerte berechnet. Die Histogramme zeigen die Mittelwerte der Replikate (Datenpunkte), sowie die größten Abweichungen nach oben und unten (hinterlegte Flächen). Die Linien zwischen den Datenpunkten dienen als optische Hilfen und stellen keine Fits dar.

4.1.3. γ H2AX kommt nicht ausschließlich in DSB-Foci vor, sondern auch pan-nukleär

Zur weitergehenden Beurteilung von pan-nukleären γ H2AX-Signalen wurde supraauflösende Lokalisationsmikroskopie (SPDM_{phymod}) eingesetzt. Neben einer sehr hohen Auflösung in der xy-Ebene (lateral) durch zeitlich getrennte Detektion und Lokalisation einzelner Fluorophore, ermöglichte dies die Betrachtung eines nur ~ 200 nm dicken optischen Schnitts durch die Zelle: Signale, die sich mehr als ~ 100 nm oberhalb oder unterhalb der Fokalebene befanden, wurden durch den Lokalisationsalgorithmus herausgefiltert und nicht berücksichtigt. Hierdurch konnte der Beitrag von Streulicht aus den γ H2AX Foci zu eventuellen pan-nukleären Signalen stark vermindert werden (für konventionelle Weitfeldmikroskopie beträgt die optische Schnittdicke mehr als $1 \mu\text{m}$).

Aus den Positionsinformationen der Fluorophore wurde für jedes γ H2AX-Signal die mittlere Distanz zu den 4 nächstgelegenen Nachbarsignalen berechnet. Diese *NN4-Distanz* ist ein Maß für die Signaldichte, bzw. die lokale γ H2AX-Konzentration und nahm für geclusterte Moleküle innerhalb der Foci besonders kleine Werte an. (siehe Abb. 4.10). Bei einer Dosis von 1 Gy und 2 Gy traten ähnliche Verteilungen der NN4-Distanzen auf. Oberhalb von 2 Gy zeigte sich dagegen eine Verschiebung hin zu größeren NN4-Distanzen, die auf das vermehrte Auftreten nicht geclusterter (pan-nukleärer) Signale hinwiesen.

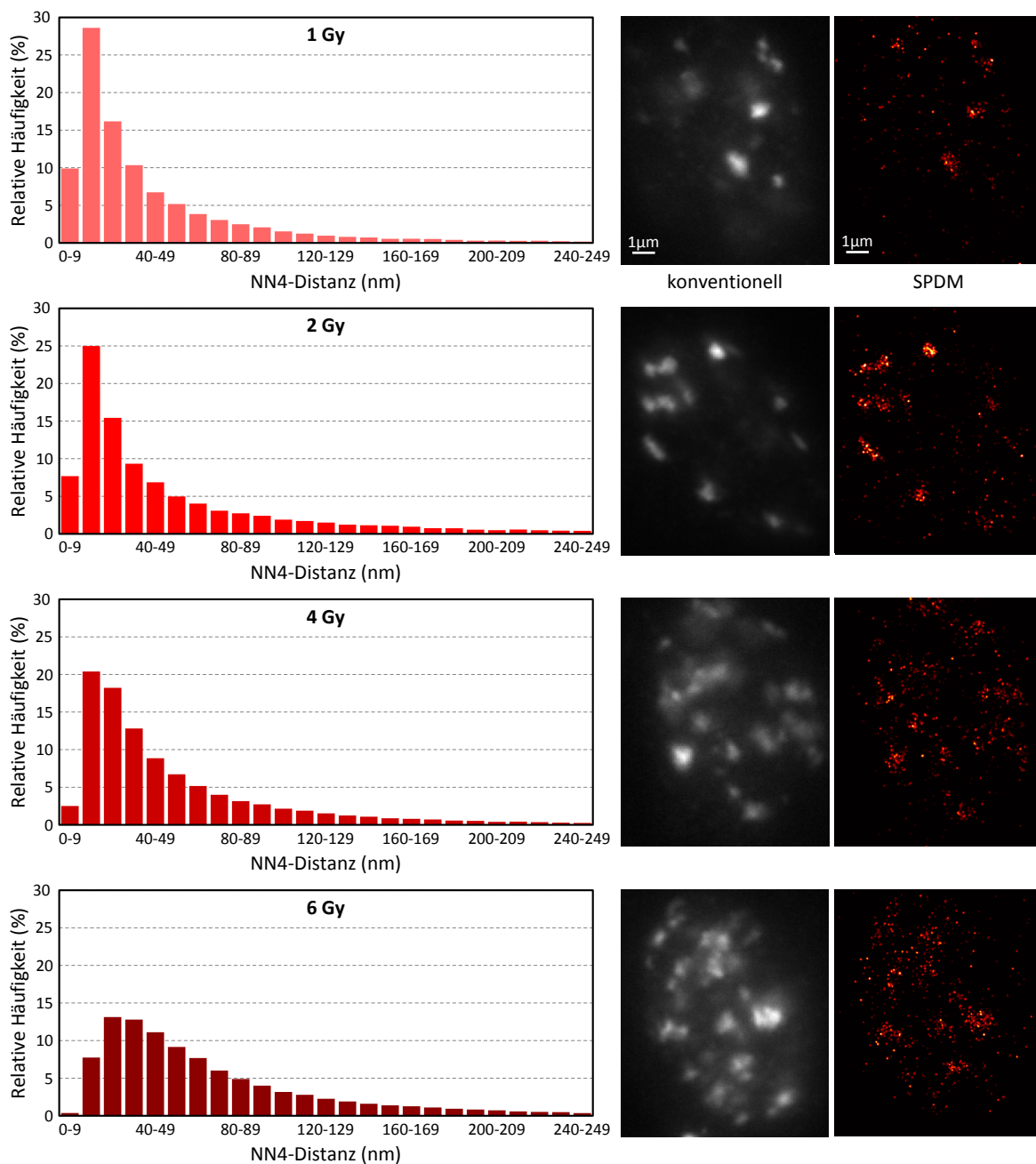


Abbildung 4.10. | NN4-Distanzen der γ H2AX-Signale nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (SPDM). Dosis-abhängige Veränderungen in der Häufigkeitsverteilung der mittleren Distanz der γ H2AX-Signale zu ihrem nächsten 4 Nachbarn (NN4-Distanz) wiesen auf die Zunahme nicht geclusterter (pan-nukleärer) Signale bei Dosen über 2 Gy hin.

4.2. Folgen von ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung im Zeitverlauf

Um die Strahlenantwort nach ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung genauer zu verfolgen, wurden Zeitreihenexperimente bei einer Dosis von 1 Gy oder 4 Gy durchgeführt. Mit Hilfe von FACS-Messungen, HCS Mikroskopie und Western Blots wurden DSB-Reparatur, Zellzyklusblockaden und die Induktion von Apoptose oder Autophagozytose bis zu 50 h nach Bestrahlung untersucht.

4.2.1. DSBs durch Photonen werden effizienter repariert als ^{12}C -Ionen-induzierte

Die Kinetik der DSB-Reparatur wurde anhand der γH2AX -Färbung verfolgt. Die gewählten Messzeitpunkte erlaubten die Beobachtung der Anstiegsphase des γH2AX -Signals bis zum Erreichen des Maximums, den Rückgang während der ersten Stunden der Reparaturphase, sowie des verbleibenden Restschadens.

Anhand der FACS-Messungen sollte zum einen die Quantität der erzeugten DSBs beurteilt werden und zum anderen ihre Qualität unter dem Aspekt der Reparaturgeschwindigkeit und des Reparaturerefolgs. Als Maß für die Quantität wurden die Spitzenwerte des γH2AX -Signals herangezogen. Der Quotient aus den Spitzenwerten nach ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung wurde verwendet um die relative dosisäquivalente Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen bei der DSB-Induktion ($\text{RDW}_{\text{Spitze}}$) auszudrücken. Um das Ausmaß des Reparaturaufwands zu vergleichen, wurde untersucht, wie schnell das γH2AX -Signal nach Erreichen des Spitzenwerts wieder abnahm und wie hoch der als irreparabel anzunehmende Restschaden war. Zu diesem Zweck wurden die relative dosisäquivalente Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen nach 1 h ($\text{RDW}_{1\text{h}}$), nach 4 h ($\text{RDW}_{4\text{h}}$) und nach 50 h ($\text{RDW}_{50\text{h}}$) ausgewertet.

Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse bei einer Dosis von 1 Gy. Mit Hilfe der MATLAB Curve Fitting Toolbox wurden Fits zu den Messpunkte bis 4 h nach Bestrahlung berechnet (Details siehe Anhang A.2). Im Allgemeinen wirkten ^{12}C -Ionen stärker als Photonen, die Aufbauphase der Reparaturantwort dauerte etwas länger und der Rückgang des γH2AX -Signals setzte verzögert ein.

Übereinstimmend mit den Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 4.2) ähnelten sich die Spitzenwerte bei gleicher Strahlenart in der S- und G2-Phase und lagen in der G1-Phase etwas höher. In der M-Phase verursachte Photonenstrahlung den höchsten Spitzenwert; für ^{12}C -Ionen traten große Schwankungen der Messwerte auf; tendenziell zeigte sich aber auch ein höherer Ausschlag als in der S- und G2-Phase.

Der Rückgang des γH2AX -Signals wies zellzyklusphasen- und strahlungsspezifische Unterschiede auf: bei Photonenstrahlung konnte die DSB-Reparatur innerhalb von 4 h fast vollständig abgeschlossen werden. Nur in G1-Zellen lag nach dieser Zeit noch ein geringer Restschaden vor. Bei ^{12}C -Ionen-Strahlung zeigte sich ein verzögerter Rückgang des γH2AX -Signals in G1 und S im Vergleich zur G2-Phase. In jedem Fall blieb der Restschaden innerhalb von 4 h über dem Niveau nach Photonenstrahlung.

In der M-Phase wurden, abgesehen von Messunsicherheiten, ähnliche Verläufe nach ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung beobachtet. Tendenziell blieb das γH2AX -Signal während der ersten Stunden der Reparaturphase bei ^{12}C -Ionen-Strahlung geringfügig höher als bei Photonenstrahlung; die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Auffallend war, dass nach 4 h in beiden Fällen das Kontrollniveau deutlich unterschritten wurde. Demnach lagen in den bestrahlten Zellen in der M-Phase weniger DSBs vor, als in den unbestrahlten. Eine mögliche

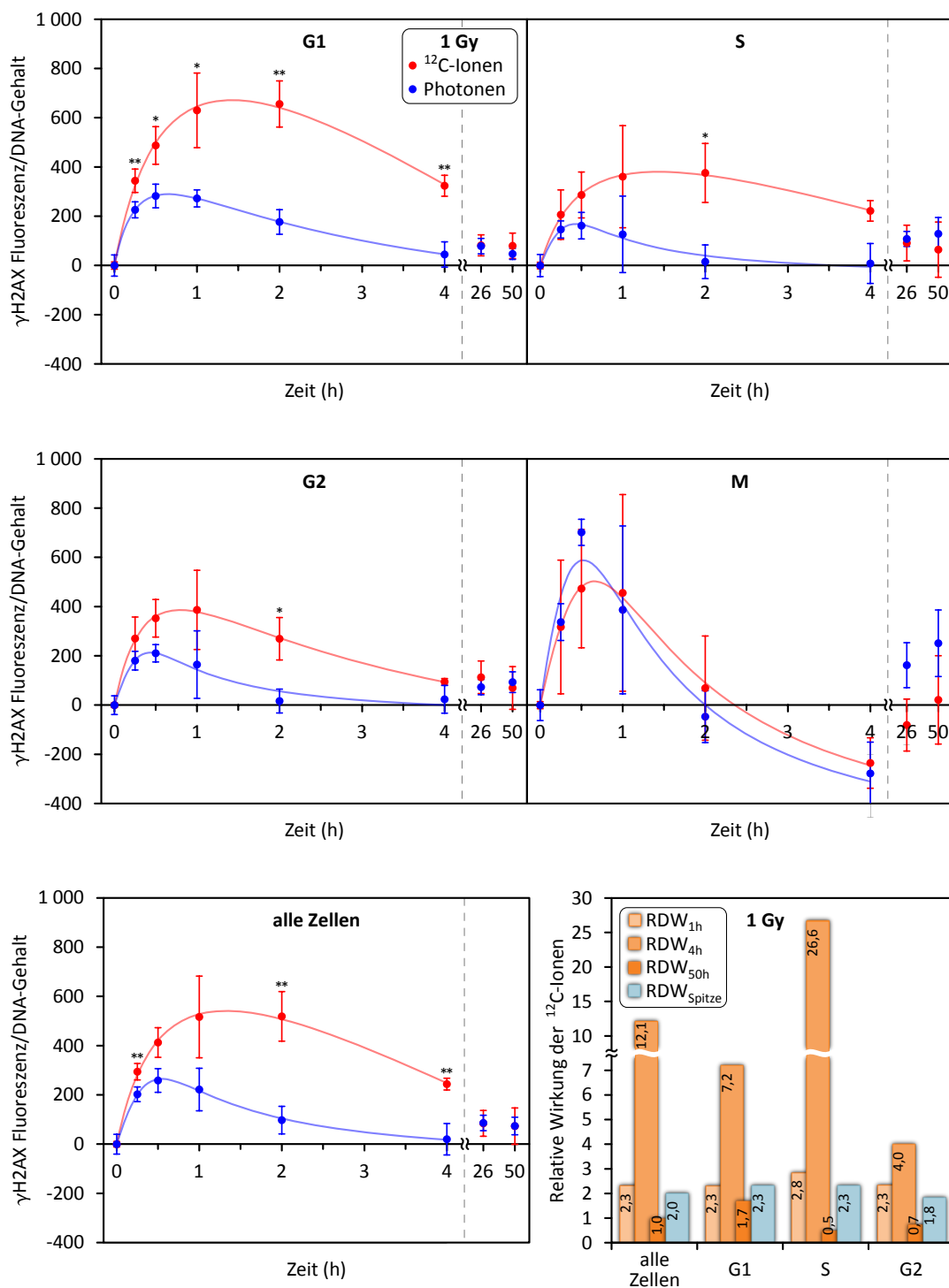


Abbildung 4.11. | Reparaturkinetik nach 1 Gy Photonen- oder ^{12}C -Ionen-Bestrahlung: Zellzyklus-spezifische γH2AX -Fluoreszenz (FACS-Messung). Mediane γH2AX -Fluoreszenzintensität nach Nullpunktkorrektur in U87 Zellen im Zeitverlauf nach Bestrahlung mit Photonen (blau) oder ^{12}C -Ionen (rot). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate, sowie zugehörige Fits (siehe Anhang A.2). Die Werte wurden auf den DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen normiert (G1: 2N, S: 3N, G2 und M: 4N, mit N=einfacher Chromosomensatz). Hochsignifikante Unterschiede sind markiert: * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$ (t-Test gemäß Abschnitt 2.6).

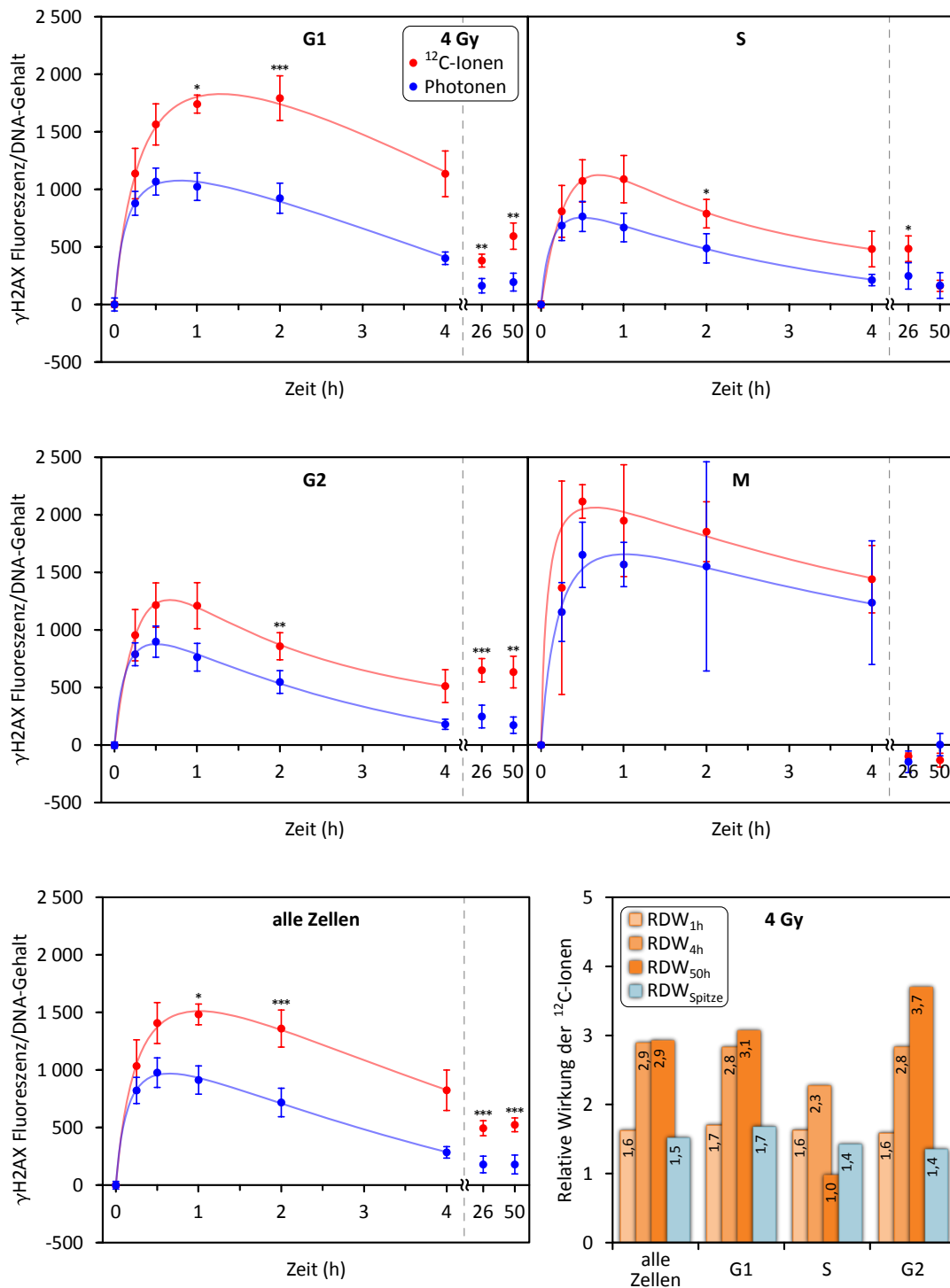


Abbildung 4.12. | Reparaturkinetik nach 4 Gy Photonen- oder ^{12}C -Ionen-Bestrahlung: Zellzyklus-spezifische γH2AX -Fluoreszenz (FACS-Messung). Mediane γH2AX -Fluoreszenzintensität nach Nullpunktkorrektur in U87 Zellen im Zeitverlauf nach Bestrahlung mit Photonen (blau) oder ^{12}C -Ionen (rot). Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate, sowie zugehörige Fits (siehe Anhang A.2). Die Werte wurden auf den DNA-Gehalt in den einzelnen Zellzyklusphasen normiert (G1: 2N, S: 3N, G2 und M: 4N, mit N=einfacher Chromosomensatz). Hochsignifikante Unterschiede sind markiert: * $p < 0,005$; ** $p < 5 \cdot 10^{-4}$; *** $p < 5 \cdot 10^{-5}$ (t-Test gemäß Abschnitt 2.6).

Erklärung hierfür wäre, dass der G2-Arrest erst ab einer Mindestanzahl an DSBs greift, so dass vorgeschädigte Zellen, die unter physiologischen Bedingungen toleriert werden, aufgrund zusätzlicher Strahlenschäden nicht mehr in die M-Phase eintreten können [188].

Nach 26 h und 50 h lagen bei Bestrahlung mit Photonen (in der M-Phase auch bei ^{12}C -Ionen) höhere γH2AX -Signale vor als nach 4 h. Dieser Effekt beruhte jedoch nicht auf einer erneuten Erhöhung des γH2AX -Signals in den bestrahlten Zellen, sondern kam nur zu Stande, weil die zugehörigen Kontrollen ein niedrigeres γH2AX -Niveau aufwiesen als am Tag der Bestrahlung; anhand der Rohdaten ohne Nullpunktkorrektur zeigte sich in keinem Fall ein Anstieg (nicht abgebildet). Die niedrigeren Kontrollwerte lassen sich auf den Rückgang stressbedingter H2AX-Phosphorylierung während der Durchführung der Experimente zurückführen. Die Restschädigung nach 26 h und 50 h wurde daher getrennt von der Entwicklung am Bestrahlungstag betrachtet. Insgesamt wiesen die bestrahlten Proben zu beiden Zeitpunkten einen geringfügigen Restschaden ohne signifikante Unterschiede zwischen ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung auf (mit Ausnahme der M-Phase).

Die Auswertung der relativen Wirksamkeit ergab, dass ^{12}C -Ionen im Durchschnitt aller Zellen einen doppelt so großen DSB Primärschaden verursachten wie Photonen (vgl. $\text{RDW}_{\text{Spitze}}$). In der G1- und S-Phase lag dieser Wert etwas über dem Durchschnitt, in der G2-Phase leicht darunter. Während der Reparaturphase ergaben sich besonders hohe RDW-Werte nach 4 h, vor allem in der S-Phase. Die nicht signifikanten Unterschiede nach 50 h führten zu einer relativen Wirksamkeit, die um den Wert 1 schwankte (siehe $\text{RDW}_{50\text{h}}$).

Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse der FACS-Messungen nach Bestrahlung mit 4 Gy. Übereinstimmend mit den den Ergebnissen bei 1 Gy, dauerte die Aufbauphase des γH2AX -Signals bei ^{12}C -Ionen-Strahlung länger als bei Photonenstrahlung und der Rückgang setzte verzögert ein. Bei gleicher Strahlenart ähnelte sich die Reparaturkinetik in der S- und G2-Phase, während in der G1- und M-Phase höhere Ausschläge und andere Kurvenformen vorlagen. In der M-Phase schwankten die Messwerte relativ stark und es gab kaum signifikante Unterschiede zwischen ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung, wobei die ^{12}C -Ionen-Kurve tendenziell oberhalb der Photonenkurve verlief.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei 1 Gy, erreichten ^{12}C -Ionen bei 4 Gy eine etwas kleinere relative Wirksamkeit bei der Primärschädigung (siehe $\text{RDW}_{\text{Spitze}}$). Die höhere Dosis hatte zur Folge, dass 4 h nicht ausreichten, um die Reparatur nach Photonenbestrahlung abzuschließen. Die Reparaturkinetik ähnelte daher dem Kurvenverlauf bei ^{12}C -Ionen-Strahlung stärker als bei 1 Gy und es ergaben sich kleinere Werte für die relative Wirksamkeit nach 4 h (siehe $\text{RDW}_{4\text{h}}$). Nach 26 h und 50 h unterschied sich die strahlenspezifische Restschädigung in der G1- S- und G2-Phase jedoch signifikant und es wurden höhere RDW-Werte gemessen als am Bestrahlungstag (siehe $\text{RDW}_{50\text{h}}$). Auffallend war, dass die relative Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen in der S-Phase bei 4 Gy kleiner blieb als in G1 und G2, entgegen der Ergebnisse bei 1 Gy.

Neben der relativen Wirksamkeit wurden anhand der Fitkurven weitere Kenngrößen zum genaueren Vergleich der Reparaturdynamik nach Photonen- und ^{12}C -Ionen-Strahlung ermittelt. Es wurde angenommen, dass das γH2AX -Signal erst nach Erreichen des Spitzenwerts für die Geschwindigkeit der DSB-Reparatur spezifisch ist, da die Reparatur in der Anstiegsphase mit Erkennungs- und Vorbereitungsprozessen überlagert, die dem Aufbau funktionsfähiger Reparaturkomplexe vorausgehen. Die Abklingzeit vom Spitzenwert auf die Hälfte wurde als Halbwertszeit der Reparaturphase definiert und verwendet, um die durchschnittliche Repa-

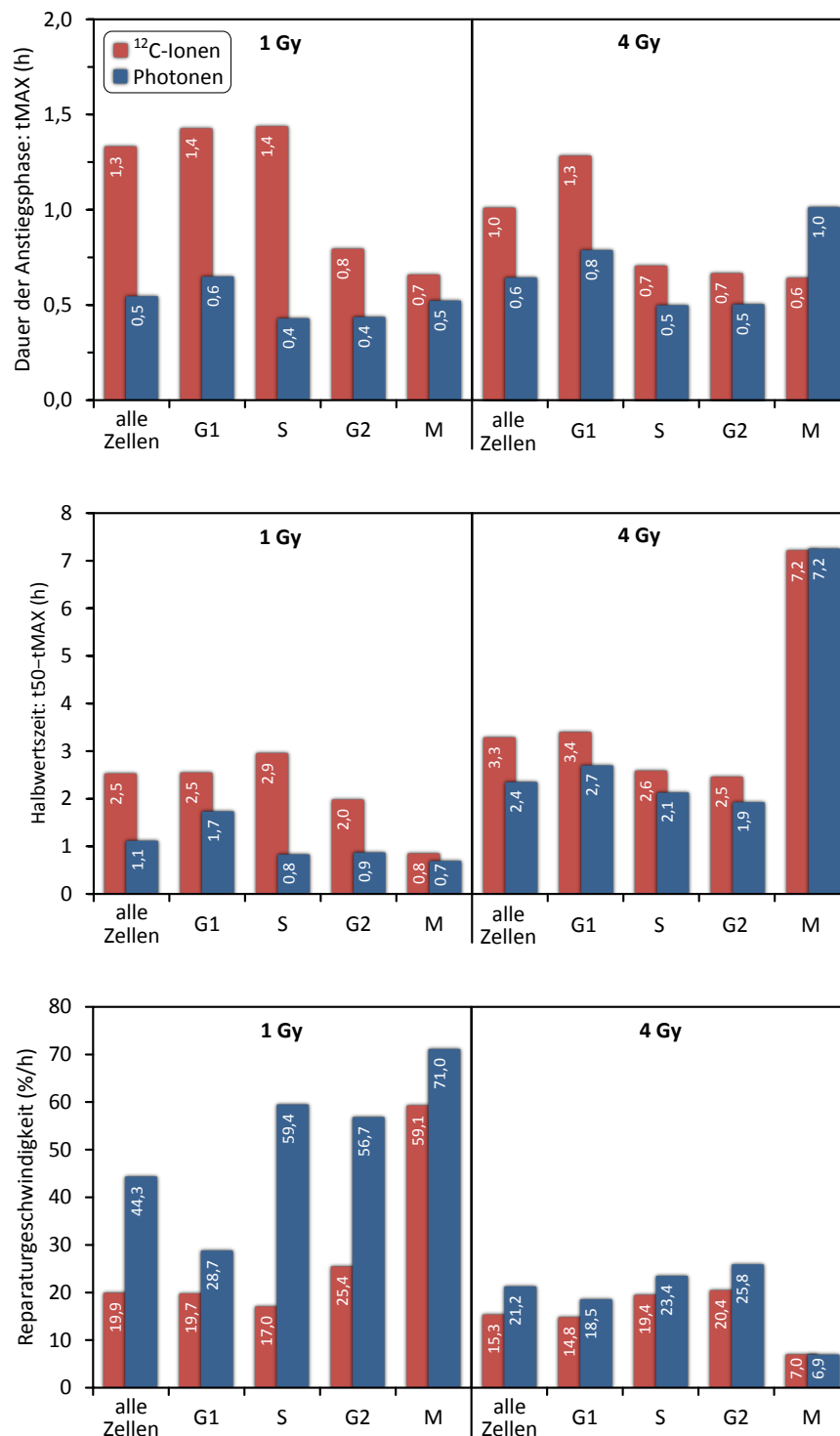


Abbildung 4.13. | Kenngrößen der DSB-Reparaturkinetik. Charakteristische Werte der DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit 1 Gy (links) und 4 Gy (rechts) Photonen (blau) oder ¹²C-Ionen (rot), basierend auf den Fits des durchflusszytometrisch gemessenen γ H2AX-Signals (siehe Abb. 4.11, 4.12 und Anhang A.2). **Oben:** Dauer der Anstiegsphase (Zeit bis zum Erreichen des Spitzenwert = tMAX). **Mitte:** Halbwertszeit der Reparaturphase (gemessen ab Spitzenwert). **Unten:** durchschnittliche relative Reparaturgeschwindigkeit innerhalb der Halbwertszeit.

raturgeschwindigkeit in %/h zu berechnen. In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse für 1 Gy und 4 Gy gegenübergestellt. Wie bereits qualitativ beschrieben, dauerte es bei ^{12}C -Ionen länger, bis der Spitzenwert erreicht wurde als bei Photonen. Im Durchschnitt aller Zellen war der Zeitunterschied bei 1 Gy (47 min) ausgeprägter als bei 4 Gy (22 min).

Die Halbwertszeiten der Reparaturphase waren bei 4 Gy länger als bei 1 Gy. Abgesehen von der M-Phase überwog die Halbwertszeit in beiden Fällen bei ^{12}C -Ionen gegenüber Photonenstrahlung, wobei die Unterschiede bei 1 Gy größer waren. Entsprechend ergaben sich für Photonen höhere Reparaturgeschwindigkeiten als für ^{12}C -Ionen, und bei 1 Gy waren die Werte höher und die Unterschiede zwischen Photonen und ^{12}C -Ionen größer als bei 4 Gy.

4.2.2. Unterschiede in der Reparaturkinetik hängen wahrscheinlich mit der Qualität der DSB-Foci zusammen

Die Ergebnisse der HCS-Mikroskopie für 1 Gy und 4 Gy sind in Abbildung 4.14 gegenübergestellt. Bei 1 Gy dauerte die Aufbauphase bis zur maximalen Ausprägung der γH2AX Foci für beide Strahlenarten etwa 1 h. Zu diesem Zeitpunkt waren die Anzahl, die Gesamtfläche pro Zellkern und die mittlere Fläche der γH2AX Foci maximal. Im Vergleich zwischen ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung zeigte sich wie bei den Dosis-Wirkungs-Analysen (Abb. 4.5), dass ^{12}C -Ionen weniger Foci verursachten, die aber größer waren als die Foci nach Photonenbestrahlung, so dass sich in der Summe etwa die gleiche Gesamtfläche pro Zellkern ergab.

Zwischen 1 h und 4 h nach Bestrahlung gab es kaum Veränderungen bei den Foci durch ^{12}C -Ionen. Bei Photonenstrahlung sank die Anzahl der Foci hingegen auf das Niveau der ^{12}C -Ionen-Kurve ab, die mittlere Fokusfläche schwankte um den Spitzenwert und in der Summe unterschritt die Gesamtfläche pro Zellkern die Werte bei ^{12}C -Ionen-Strahlung. Nach 26 h und 50 h überwog der Restschaden durch ^{12}C -Ionen gegenüber dem durch Photonen in Bezug auf Anzahl und Größe der Foci.

Bei 4 Gy erreichten die γH2AX Foci bereits nach 15–30 min ihre maximale Ausprägung; im weiteren Verlauf zeigte sich eine ähnliche Charakteristik wie bei 1 Gy: Die Fokusanzahl fiel bei Photonenstrahlung stärker ab als bei ^{12}C -Ionen, die mittlere Fokusfläche stabilisierte sich nach anfänglichen Schwankungen auf ähnliche Werte wie bei 1 Gy ($\sim 0,65\mu\text{m}^2$ bei ^{12}C -Ionen und $\sim 0,45\mu\text{m}^2$ bei Photonen) und die zunächst gleich große Gesamtfläche der Foci überwog bei ^{12}C -Ionen ab einer Reparaturzeit von 1 h. Nach 26 h und 50 h überwog die Anzahl und Größe der ^{12}C -Ionen-induzierten Foci, wobei vor allem die Anzahl und Gesamtfläche zwischen beiden Zeitpunkten deutlich abnahm. Wie bei den FACS-Messungen wurde das Kontrollniveau jedoch in keinem Fall wieder ganz erreicht.

4.2.3. Homologe Rekombination spielt bei ^{12}C -Ionen-Strahlung eine besonders wichtige Rolle für die DSB-Reparatur

Die DSB-Reparatur durch homologe Rekombination (HRR) wurde mit Hilfe von Western Blots verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Nachgewiesen wurden phosphoryliertes BRCA1 (pBRCA1), sowie die Rekombinasen Rad51 und Rad52 (p-Rad52 = phosphorylierte Form).

pBRCA1 begünstigt HRR an Stelle von nicht-homologer End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) und ist an mehreren Schritten der HRR beteiligt.

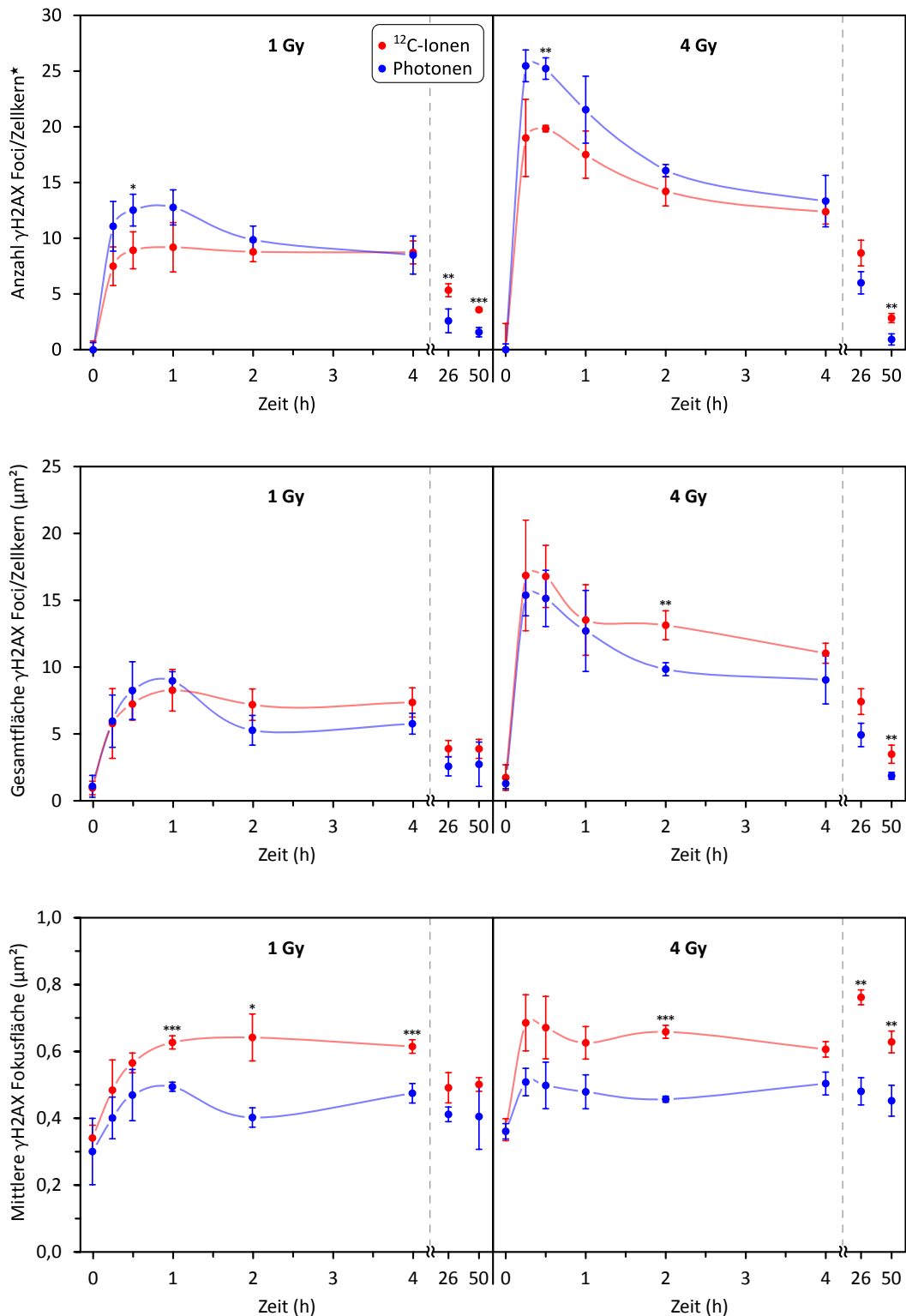


Abbildung 4.14. | Reparaturkinetik nach Photonen- oder ^{12}C -Ionen-Bestrahlung: γ H2AX Foci (HCS Mikroskopie). Oben: Mediane Anzahl der γ H2AX Foci/Zellkern (*Nullpunkt-korrigiert). Mitte: Gesamtfläche der γ H2AX Foci/Zellkern. Unten: mittlere γ H2AX Fokusfläche. Die Diagramme zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts) Photonen (blau) oder ^{12}C -Ionen (rot). Die Linien zwischen den Messpunkten dienen als optische Hilfen und stellen keine Fits dar. Hochsignifikante Unterschiede sind markiert: * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$; *** $p < 1 \cdot 10^{-4}$ (t-Test gemäß Abschnitt 2.6).

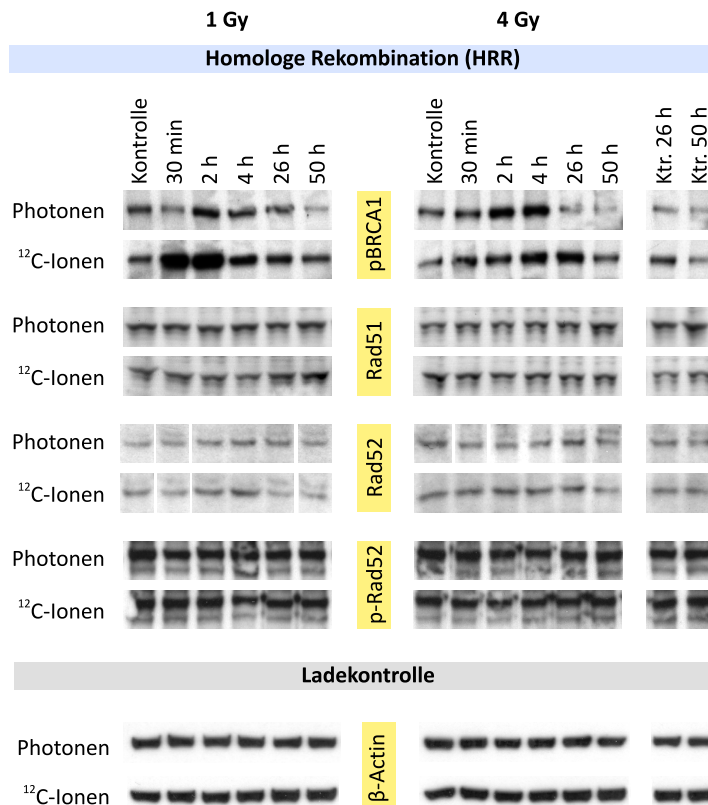


Abbildung 4.15. | *DSB-Reparatur durch HRR (Western Blots). Auswirkung von ¹²C-Ionen- und Photonenstrahlung auf die HRR-Proteine pBRCA1, Rad51 und Rad52 (p-Rad52 = phosphorylierte Form) bei einer Dosis von 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts).*

Bei 1 Gy bewirkten ¹²C-Ionen einen starken pBRCA1-Anstieg mit maximaler Ausprägung zwischen 30 min und 2 h nach Bestrahlung. Danach sank die Konzentration, blieb jedoch auch nach 50 h noch leicht gegenüber dem Kontrollniveau erhöht. Photonen bewirkten einen verzögerten Effekt, der deutlich schwächer ausfiel als bei ¹²C-Ionen und kürzer andauerte. Die pBRCA1-Konzentration erhöhte sich erst nach 2 h und lag nach 50 h wieder auf Kontrollniveau. Bei 4 Gy reagierten die Zellen langsamer auf ¹²C-Ionen und schneller auf Photonenstrahlung. Die pBRCA1-Konzentration blieb nach Bestrahlung mit ¹²C-Ionen länger erhöht, jedoch unterschied sich die Stärke der Erhöhung im Vergleich zu Photonenstrahlung weniger deutlich als bei 1 Gy.

Rad51 vermittelt die Stranginvasion und Homologiesuche während der Synapse.

Die Bestrahlung hatte keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration von Rad51.

Rad52 stimuliert Rad51 und unterstützt die Stranginvasion und Homologiesuche.

Die Bestrahlung hatte weder Einfluss auf die Proteinkonzentration, noch die Phosphorylierung (p-Rad52) von Rad52.

Die länger anhaltende Phosphorylierung von BRCA1 durch ¹²C-Ionen-Strahlung deutete darauf hin, dass bei ¹²C-Ionen-Strahlung die HRR eine größere Bedeutung für die DSB-Reparatur hat als bei Photonenstrahlung. Bemerkenswert war, dass beide Strahlenarten gegenteilige Effekte im Ansprechverhalten von pBRCA1 bei verschiedenen Dosen zeigten. Überraschend

war hierbei die besonders schnelle und starke BRCA1-Aktivierung bei 1 Gy ^{12}C -Ionen. Da keine Veränderung der Rad51- und Rad52-Konzentration festgestellt werden konnten, ist von einem ausreichendem Vorrat dieser Proteine auszugehen, der keine gesteigerte Expression erforderlich machte.

4.2.4. ^{12}C -Ionen verursachen stärkere und länger anhaltende Zellzyklusblockaden als Photonen

Um den Einfluss der Strahlung auf die Zellzyklusprogression zu erfassen, wurde die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen mit Hilfe von FACS-Messungen bestimmt. Außerdem wurde die Zellkerngröße mit dem HCS-Mikroskop gemessen und die wichtigsten Proteine der Zellzyklus-Regulation wurden mit Western Blots untersucht.

Abbildung 4.16 zeigt die Ergebnisse der FACS-Messungen bei 1 Gy. Innerhalb von 1 h nach Bestrahlung erhöhte sich für beide Strahlenarten der G1-Anteil leicht zu Lasten der S-Phase. Eine solche Verschiebung weist auf einen G1/S-Arrest hin, der bei Photonenstrahlung stärker ausgeprägt war als bei ^{12}C -Ionen, jedoch in beiden Fällen eher gering ausfiel. Nachfolgend kehrte sich der Effekt um (bei Photonen bereits nach 1 h, bei ^{12}C -Ionen erst zwischen 2–4 h nach Bestrahlung). Der Anteil der M-Phase verringerte sich (bei Photonen merklich erst nach 4 h, bei ^{12}C -Ionen bereits ab 2 h nach Bestrahlung) und der G2-Anteil erhöhte sich nach 4 h. Diese Verschiebung wies auf das Einsetzen einer Zellzyklusblockade am G2/M-Übergang hin. Der Effekt war bei ^{12}C -Ionen-Strahlung stärker ausgeprägt (fast keine Mitosen mehr nach 4 h) und hielt länger an als bei Photonenstrahlung (Vgl. Werte nach 4 h). Die für beide Strahlenarten beobachtete Reduktion der G1-Phase nach 4 h ließ sich als unmittelbare Folge des G2/M-Arrests erklären.

Nach 26 h und 50 h zeigte sich bei Photonenstrahlung ein gegenüber den Kontrollen erhöhter G1-Anteil und ein verringerter G2-Anteil. Im Gegensatz dazu wurde 26 h nach ^{12}C -Ionen-Bestrahlung ein nur leicht erhöhter G1-Anteil und ein normales G2-Niveau gemessen; nach 50 h lag der G1-Anteil tendenziell unter dem Kontrollniveau (nicht signifikant) und der G2-Anteil war signifikant erhöht. Für beide Strahlenarten stimmte nach 26 h und 50 h der M-Anteil mit dem Kontrollniveau überein und der Anteil der S-Phase lag nur geringfügig darunter.

Bei 4 Gy gab es innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung kaum Veränderungen in der Zellzyklusverteilung und kein deutliches Indiz für einen G1/S-Arrest. Zwischen 2 und 4 h nach Bestrahlung stieg der Anteil der Zellen in der S-Phase an. Wie bei 1 Gy fiel dieser Anstieg bei Photonenstrahlung etwas deutlicher aus als bei ^{12}C -Ionen; insgesamt zeigte sich eine stärkere Erhöhung gegenüber den Kontrollen als bei 1 Gy. Im gleichen Zeitintervall fiel auf, dass sich der G2-Anteil bei Photonenstrahlung erhöhte, bei ^{12}C -Ionen jedoch nicht, obwohl in beiden Fällen fast keine mitotischen Zellen mehr vorlagen.

An den Folgetagen traten die prägnantesten Veränderungen auf: für beide Strahlenarten lag der Anteil der S-Phase deutlich unterhalb des Kontrollniveaus. Bei ^{12}C -Ionen-Strahlung war zudem der G1-Anteil verringert und der G2-Anteil stark erhöht. Bei Photonenstrahlung zeigte sich im Gegensatz dazu nach 26 h ein erhöhtes G1-Niveau und der G2-Anteil war etwa so groß wie in den Kontrollen. Nach 50 h normalisierte sich der G1-Anteil und der G2-Anteil stieg an, blieb jedoch deutlich kleiner als bei ^{12}C -Ionen-Strahlung.

Insgesamt sprachen die FACS-Ergebnisse dafür, dass beide Strahlenarten Zellzyklusblockaden sowohl am G1/S-, als auch am G2/M-Übergang auslösten, wobei der G1/S-Arrest

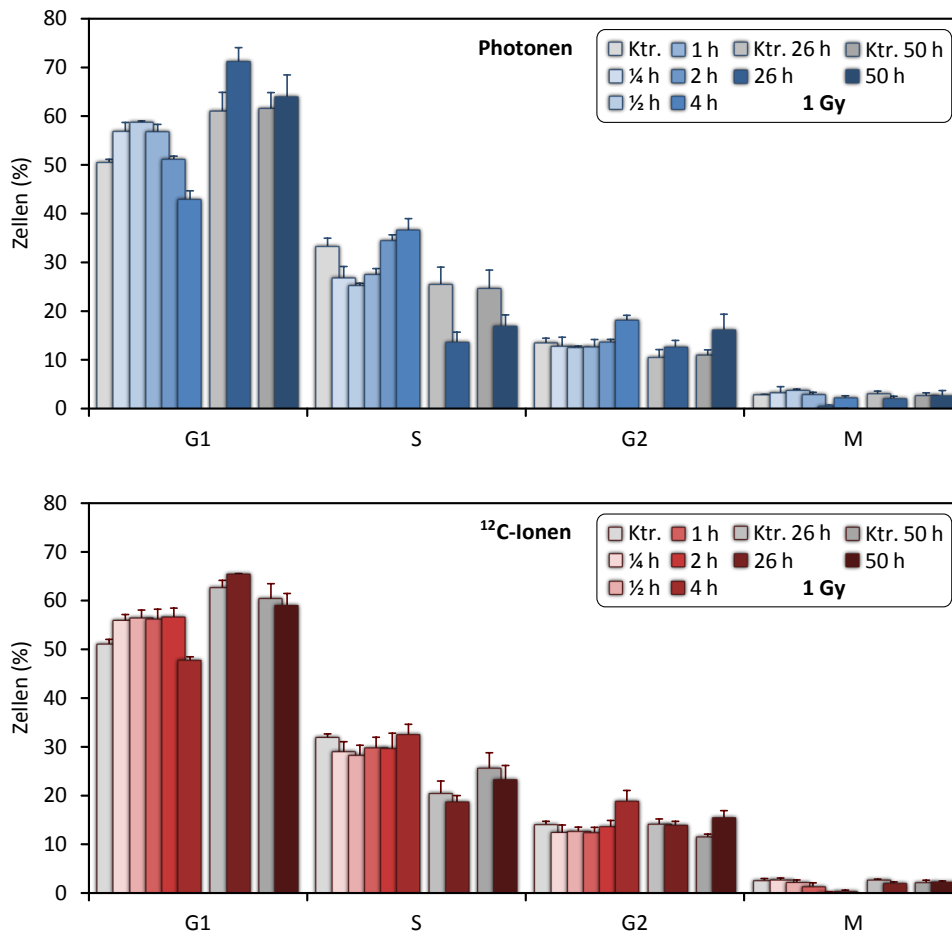


Abbildung 4.16. | Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung mit 1 Gy Photonen oder ¹²C-Ionen (FACS-Messung). Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen an der gesamten Zellpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach Bestrahlung (Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate). Die Daten wurden zeitlich gruppiert (0–4 h, 26 h und 50 h nach Bestrahlung); jede Gruppe enthält eine Säule von unbestrahlten Kontrollen als Referenzwert (grau).

bei Photonenstrahlung eine größere Rolle zu spielen schien als bei ¹²C-Ionen-Strahlung, und der G2/M-Arrest bei ¹²C-Ionen-Strahlung dominierte. Zur abschließenden Einordnung mussten jedoch weitere Daten berücksichtigt werden, da die Überwindung der Blockade in einer bestimmten Zellzyklusphase zu temporären Effekten in den übrigen Phasen führen kann, die leicht als weitere Blockade fehlinterpretiert werden können. An den Folgetagen nach Bestrahlung mussten außerdem die Auswirkungen der Apoptose auf die Verteilung der Zellzyklusphasen in die Beurteilung einbezogen werden.

Da sich die Zellkerngröße mit der Zellzyklusphase ändert, wirken sich große Verschiebungen zwischen den Zellzyklusphasen auf die mittlere Zellkerngröße aus. Mit Hilfe des HCS-Mikroskops wurde die Zellkernfläche anhand der DAPI-Färbung bestimmt. Wie in Abbildung 4.18 ersichtlich ist, reichten die relativ kleinen Verschiebungen zwischen den Zellzyklusphasen bei Bestrahlung mit 1 Gy Photonen oder ¹²C-Ionen nicht aus, um zu merklichen Unterschieden gegenüber den Kontrollen zu führen. Es fiel lediglich auf, dass die Zellen am Bestrahlungstag im Durchschnitt etwas größer waren als an den beiden Folgetagen. Damit übereinstimmend hatten die FACS-Messungen ergeben, dass der G1-Anteil am Bestrahlungs-

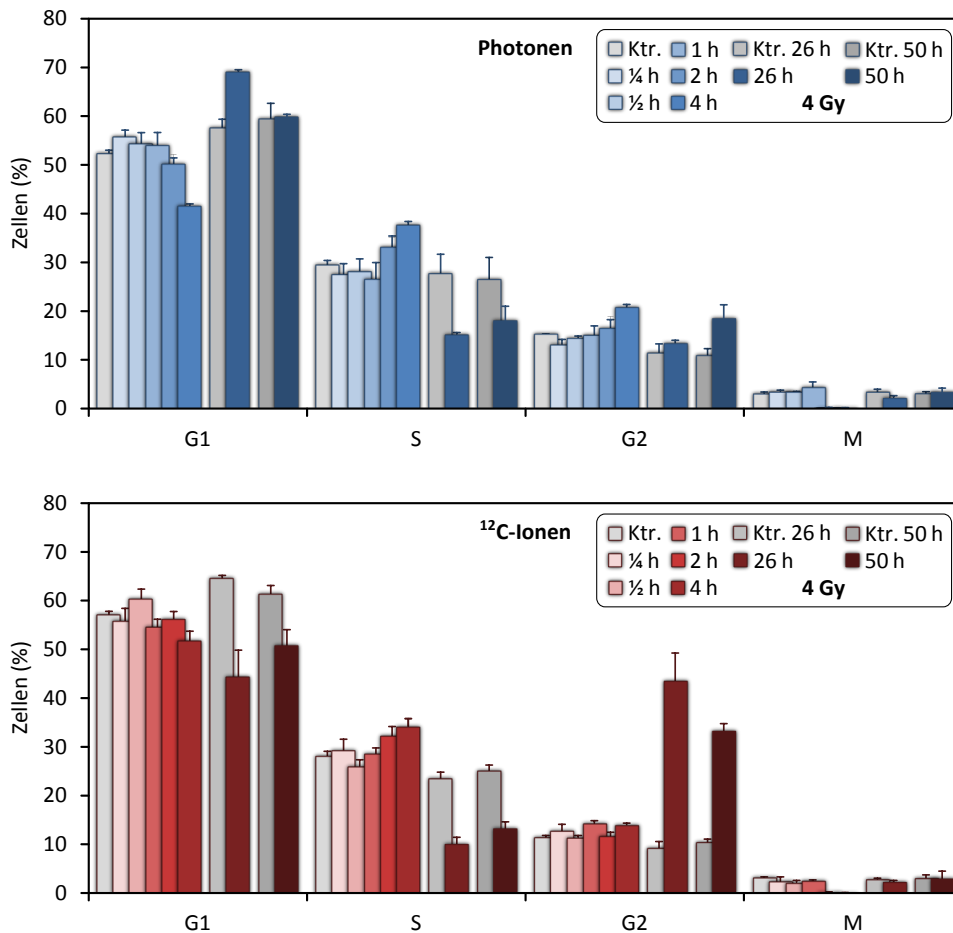


Abbildung 4.17. | Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung mit 4 Gy Photonen oder ¹²C-Ionen (FACS-Messung). Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen an der gesamten Zellpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach Bestrahlung (Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate). Die Daten wurden zeitlich gruppiert (0–4 h, 26 h und 50 h nach Bestrahlung); jede Gruppe enthält eine Säule von unbestrahlten Kontrollen als Referenzwert (grau).

tag niedriger war als an den Folgetagen. Dies bestätigte die Vermutung, dass die Proliferationsrate in den Kontrollen für den 26 h und 50 h Zeitpunkt trotz angepasster Einsaatdichte bereits abnahm, womit sich vergleichsweise niedrige γ H2AX-Werte erklären lassen (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Ergebnisse für 4 Gy sind in Abbildung 4.19 zu sehen. Hier schlugen sich die Abnahme des G1-Anteils und die gleichzeitige Zunahme des G2-Anteils 26 h und 50 h nach Bestrahlung mit ¹²C-Ionen in einer deutlichen Zunahme der mittleren Zellkernfläche nieder.

Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse der Western Blots zur Zellzyklus-Regulation. Untersucht wurden die Cycline A2, B1 und E2, sowie die an Tyr15 phosphorylierte (inaktive) Form der Cyclin-abhängigen Kinase CDK1 (p-CDK1).

Chk2 wird als Reaktion auf DSBs von ATM durch Phosphorylierung aktiviert (p-Chk2) und löst dann Zellzyklusblockaden am G1/S oder G2/M-Übergang aus.

Bereits 30 min nach Bestrahlung stieg die p-Chk2 Konzentration stark an und blieb bei 4 Gy unabhängig von der Strahlenart bis zu 50 h lang erhöht. Bei 1 Gy sank die

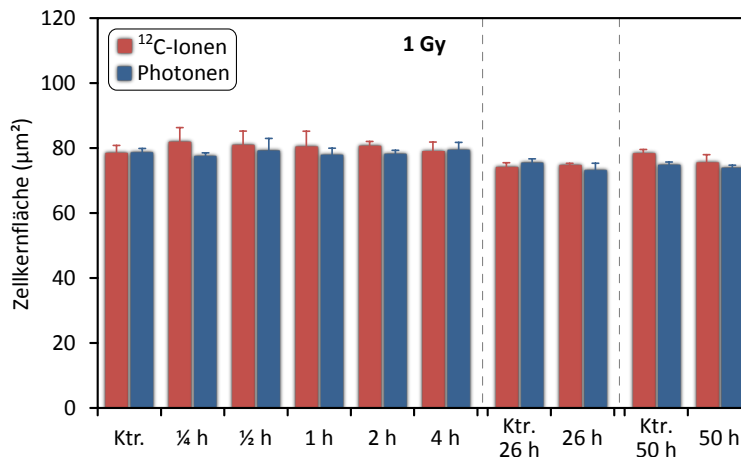


Abbildung 4.18. | Veränderungen der Zellkerngröße nach Bestrahlung mit 4 Gy Photonen oder ^{12}C -Ionen (HCS-Mikroskopie). Die insgesamt kleinen Verschiebungen in der Zellzyklusverteilung (siehe Abb. 4.16) reichten nicht aus, um sich anhand der mittleren Zellkernfläche bemerkbar zu machen.

Konzentration nach 4 h wieder und lag nach 26 h und 50 h bei Photonenstrahlung etwa auf dem Kontrollniveau, bei ^{12}C -Ionen leicht darüber.

p21 bindet an aktive CDKs und inhibiert diese, wobei vorwiegend G1/S-Blockaden ausgelöst werden.

Unabhängig von der Strahlenart stieg die p21-Expression zwischen 4 und 50 h nach Bestrahlung an, wobei der Effekt bei 4 Gy deutlich stärker ausfiel als bei 1 Gy.

CDK1 wird durch Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 (p-CDK1) inaktiviert, wodurch der Eintritt in die M-Phase verhindert wird.

Photonenstrahlung führte zu keinen nennenswerten Veränderungen gegenüber den unbestrahlten Kontrollen. ^{12}C -Ionen verursachten bei 1 Gy eine verstärkte Phosphorylierung nach 4 h, die zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar war. Bei 4 Gy stieg der Phosphorylierungsgrad bereits nach 30 min an und blieb auch nach 26 h noch deutlich erhöht. Erst nach 50 h war kein Unterschied mehr gegenüber den Kontrollen erkennbar.

Cyclin A2 wird ab der S-Phase kontinuierlich stärker exprimiert und erreicht seine maximale Konzentration in der G2-Phase. Cyclin A ist sowohl für die DNA-Replikation, als auch den Eintritt in die Mitose bis hin zur Vollendung der Prophase erforderlich.

Während 1 Gy Photonenstrahlung kaum Einfluss auf die Cyclin A2-Konzentration hatte, zeigte sich bei 1 Gy ^{12}C -Ionen-Strahlung ein Anstieg zwischen 30 min und 4 h nach Bestrahlung. Nach 26 h war keine Erhöhung mehr feststellbar. Bei 4 Gy Photonenstrahlung zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei 1 Gy ^{12}C -Ionen. Bei 4 Gy ^{12}C -Ionen fiel die Reaktion stärker und deutlich länger aus: die Cyclin A2-Konzentration erhöhte sich stetig zwischen 30 min und 26 h nach Bestrahlung und lag trotz eines Rückgangs nach 50 h noch immer über dem Kontrollniveau.

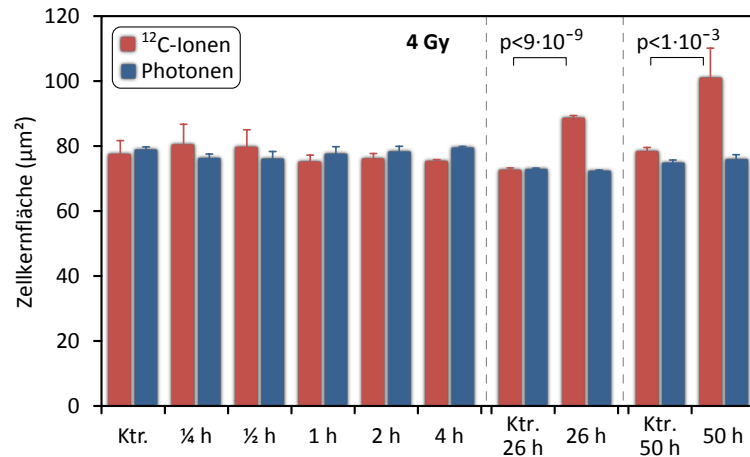


Abbildung 4.19. | *Veränderungen der Zellkerngröße nach Bestrahlung mit 4 Gy (HCS-Mikroskopie). Übereinstimmend mit der Zunahme an großen G2 Zellen (siehe Abb.4.17) war die Zellkernfläche 26 und 50 h nach ¹²C-Ionen-Bestrahlung signifikant erhöht ($p < 0,05$).*

Cyclin B1 akkumuliert in der G2-Phase und wird mit dem Einsetzen der M-Phase rasch abgebaut.

Bei 1 Gy zeigten sich unabhängig von der Strahlenart ähnliche Schwankungen der Cyclin B1 Konzentration: nach 30 min war sie leicht erhöht, ging nach 2 h zurück und erreichte nach 4 h ihr Maximum. Bei ¹²C-Ionen-Strahlung fiel der Einbruch nach 2 h und die Erhöhung nach 4 h stärker aus als bei Photonenstrahlung. Bei 4 Gy zeigte sich ein anderes Bild: Photonenstrahlung führte bis zu 4 h zu einer Erhöhung, mit einem Maximum nach 2 h. Dem gegenüber schwankte der Cyclin B1 Gehalt bei ¹²C-Ionen während der ersten 4 h nach der Bestrahlung und war nach 26 h am stärksten erhöht.

Cyclin E2 ist für den Übergang von der G1- in die S-Phase und die Initiation der DNA-Replikation erforderlich und erreicht am G1/S-Kontrollpunkt die maximale Konzentration. Sobald der Eintritt in die S-Phase erfolgt, wird Cyclin E2 ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Die Akkumulation von Cyclin E2 ist daher ein Marker für das Einsetzen einer G1/S-Blockade.

1 Gy Photonenstrahlung bewirkte einen leichten Rückgang der Cyclin E2-Konzentration nach 26 h und 50 h. Bei ¹²C-Ionen-Strahlung setzte bereits nach 2 h ein Rückgang ein, der nach 26 h und 50 h stärker ausfiel als bei Photonenstrahlung. Bei 4 Gy riefen beide Strahlenarten einen starken Einbruch von Cyclin E2 nach 26 h und 50 h hervor, der zu dem Rückgang der S-Phase passte, welcher bei den durchflusszytometrischen Zellzyklusmessungen beobachtet wurde.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass ¹²C-Ionen-Strahlung sowohl am G1/S-, wie auch am G2/M-Kontrollpunkt für länger andauernde Blockaden sorgte als Photonenstrahlung gleicher Dosis. Die Unterschiede traten bei 4 Gy deutlicher hervor als bei 1 Gy.

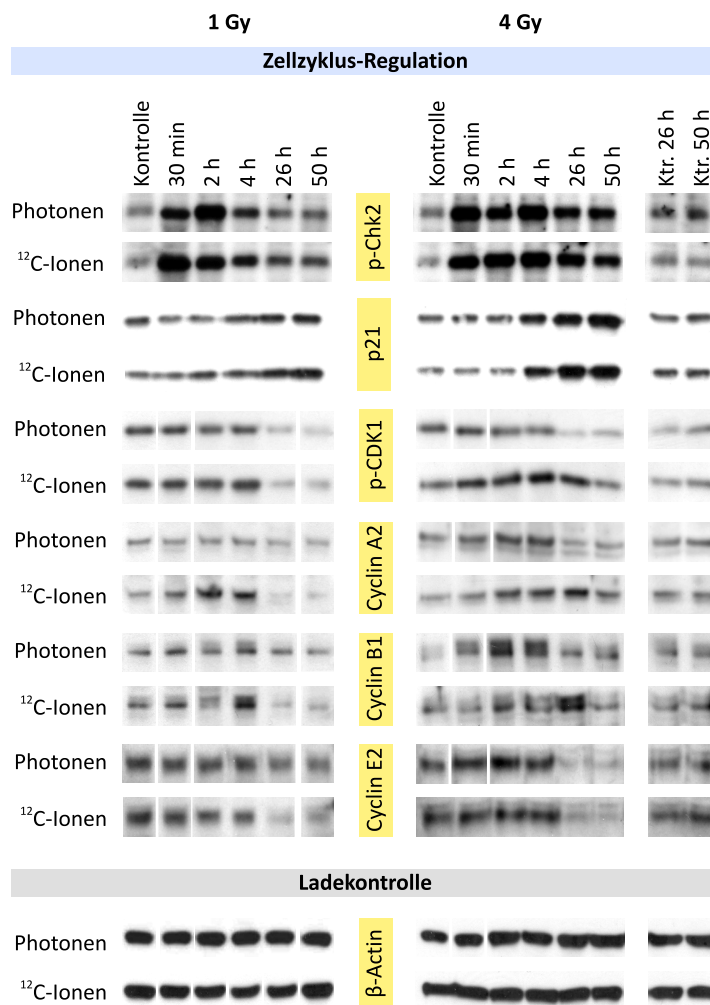


Abbildung 4.20. | Zellzyklus-Regulation (Western Blots). Auswirkung von ¹²C-Ionen- und Photonenstrahlung auf die Aktivierung von Chk2 (p-Chk2) und CDK1 (p-CDK1 = inaktive Form), sowie die Konzentration von p21 und der Cycline A2, B1 und E2 bei einer Dosis von 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts).

4.2.5. ¹²C-Ionen lösen Apoptose effizienter aus als Photonen

Die Induktion von Apoptose wurde 26 h und 50 h nach Bestrahlung mit Hilfe von FACS-Messungen anhand der Caspase-3-Aktivierung und des subG1-Peaks untersucht. Abbildung 4.21 zeigt die Ergebnisse der FACS-Messungen. Bei 1 Gy führte ¹²C-Ionen-Strahlung zu einem kleinen Prozentsatz Caspase-3-positiver Zellen (Casp3⁺⁺) und zu beiden Zeitpunkten lagen ca. 1% der Zellen im subG1-Bereich. Bei Photonenstrahlung blieb sowohl der Anteil der Caspase-3-positiven Zellen, als auch der subG1-Zellen im Durchschnitt unterhalb von 0,5%. Vor allem gemessen an der Caspase-3-Aktivierung, ergaben sich deshalb hohe RBE-Werte.

Bei 4 Gy wurden erheblich mehr apoptotische Zellen gemessen als bei 1 Gy. Nach 26 h war ein Drittel der ¹²C-Ionen-bestrahlten Zellen Caspase-3-positiv, bei Photonenstrahlung lag der Durchschnitt bei 8,3%. Trotz des Rückgangs beider Werte am Folgetag, steigerte sich der Anteil der subG1-Zellen nach 50 h auf 2,4% bei Photonen- und 6,2% bei ¹²C-Ionen-Strahlung. Anhand des subG1-Anteils nach 50 h stimmte die relative Wirkung der ¹²C-Ionen (RDW_{subG1}) nach 4 Gy mit dem Wert für 1 Gy überein (2,6).

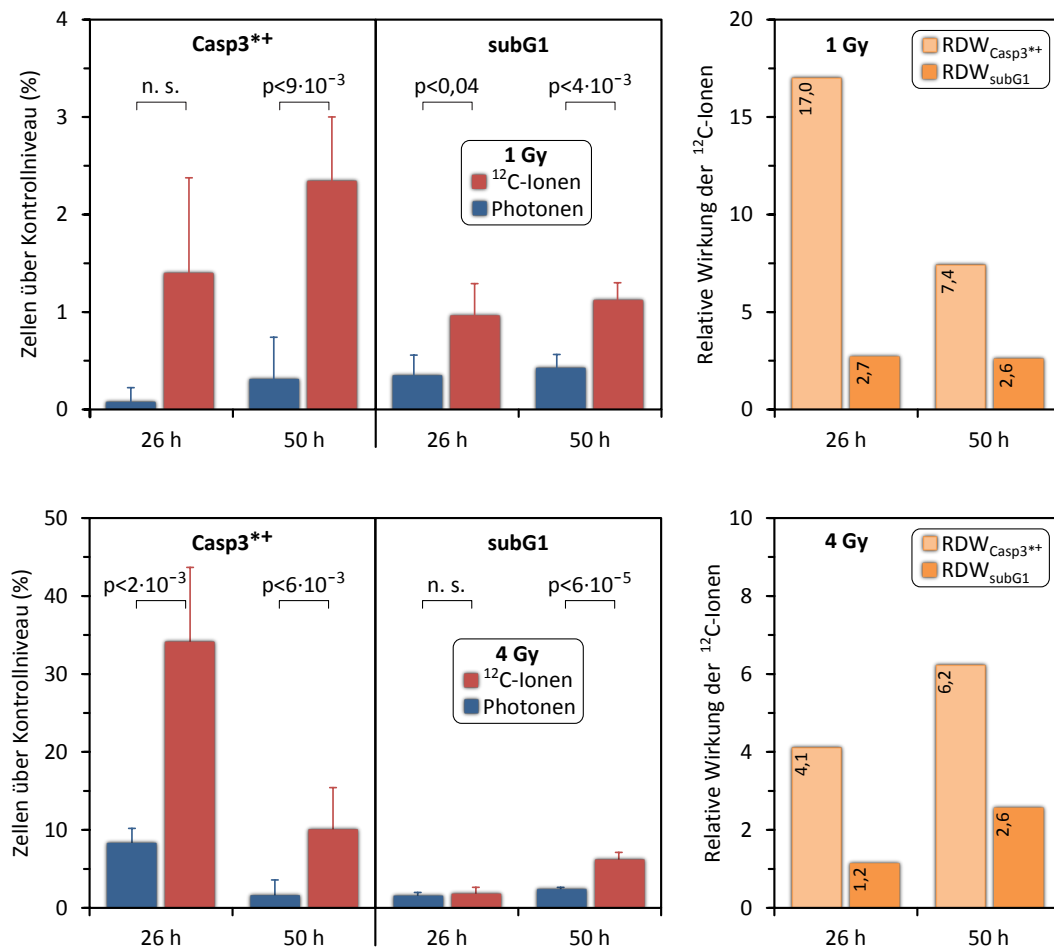


Abbildung 4.21. | Apoptose nach Photonen- oder ^{12}C -Ionen-Bestrahlung. Links: Caspase-3-Aktivierung (Casp3⁺⁺) und DNA-Fragmentation (subG1) in U87 Zellen 26 h und 50 h nach Bestrahlung mit 1 Gy (oben) und 4 Gy (unten) Photonen (blau) oder ^{12}C -Ionen (rot). Rechts: relative dosisäquivalente Wirkung der ^{12}C -Ionen für Caspase-3-Aktivierung (RDW_{Casp3⁺⁺}) und DNA-Fragmentation (RDW_{subG1}).

Weiter wurde untersucht, in welcher Zellzyklusphase die Zellen am anfälligsten für Apoptose waren. Dazu wurde 26 h und 50 h nach Bestrahlung die Zellzykluspezifische Verteilung und Anhäufung der Casp3⁺⁺ Zellen ermittelt. Zur Bestimmung der Anhäufung wurde der Quotient aus der Häufigkeit der Casp3⁺⁺ Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase und dem Anteil dieser Phase an der Gesamtpopulation berechnet (Casp3⁺⁺ Index). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Bei 1 Gy stammten die meisten Casp3⁺⁺ Zellen aus der G1-Phase, waren aber im Verhältnis zur Zellzyklusphasen-Verteilung nur in der G2-Phase überrepräsentiert. Bei ^{12}C -Ionen war die Anhäufung in der G2-Phase ausgeprägter als bei Photonen, der absolute Anteil der G1-Phase war etwas niedriger und der G2-Anteil etwas höher. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht eindeutig signifikant.

Bei 4 Gy befand sich der Großteil der Casp3⁺⁺ Zellen in der G2-Phase. Übereinstimmend mit den Ergebnissen bei 1 Gy wurde in der G2-Phase eine Anhäufung der Casp3⁺⁺ Zellen beobachtet; im Gegensatz zu 1 Gy war diese Anhäufung bei Photonen stärker ausgeprägt als bei ^{12}C -Ionen. Die G1-Phase war bei 4 Gy zu beiden Zeitpunkten unterrepräsentiert.

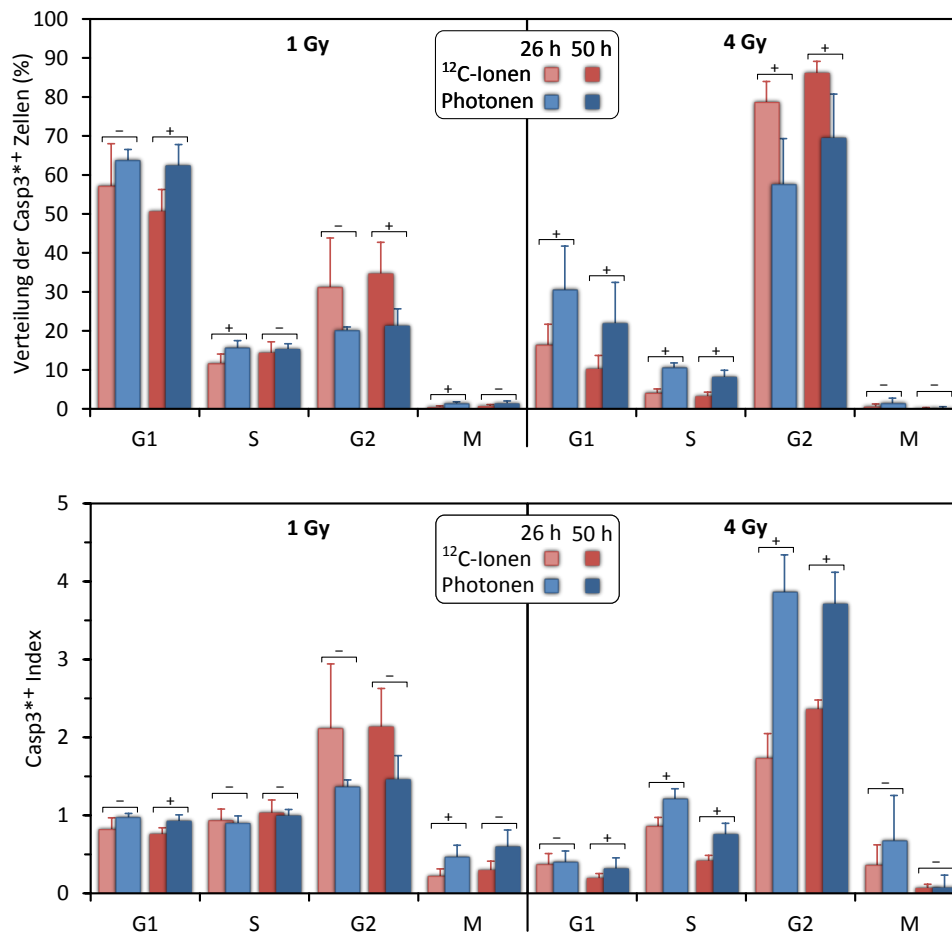


Abbildung 4.22. | Zellzyklusanalyse der Casp3+ Zellen.** Oben: Zellzyklusspezifische Verteilung und unten: Anhäufung der Casp3**+ Zellen 26 h und 50 h nach Bestrahlung mit 1 Gy (links) und 4 Gy (rechts) Photonen (Blautöne) oder ¹²C-Ionen (Rottöne). Der Casp3**+ Index ist der Quotient aus der Häufigkeit der Casp3**+ in einer bestimmten Zellzyklusphase und dem Anteil dieser Phase an der Gesamtpopulation. + signifikant ($p < 0,05$); - nicht signifikant ($p > 0,05$), t-Tests gemäß Abschnitt 2.6.

Zusammenfassend waren die Zellen in der G2-Phase am anfälligsten für Apoptose, wobei sich dosisabhängige Unterschiede im Casp3**+ Index zeigten: bei Photonenstrahlung steigerte sich die Anhäufung der Apoptose in der G2-Phase mit der Dosis.

4.2.6. Autophagozytose spielt keine Rolle für die Strahlenantwort in U87 Zellen

Mit Hilfe von Western Blots wurde untersucht, ob die Bestrahlung in U87 Zellen zu Autophagozytose führt. Abbildung 4.23 zeigt die Ergebnisse.

Beclin-1, Atg5, Atg7 und **Atg12** sind an der Keimung der Isolationsmembran zur Einleitung der Autophagozytose beteiligt.

Die Bestrahlung hatte keinen Einfluss auf die Konzentration dieser Proteine.

Atg3 und **Atg7** vermitteln die Reifung der Isolationsmembran zum Autophagosom durch Anhängen eines Lipids an **LC3A** und **LC3B**.

Auch hier konnten keine Konzentrationsänderungen festgestellt werden. Zudem zeigte sich weder für LC3A, noch für LC3B die Bande der schneller migrierenden Lipidform.

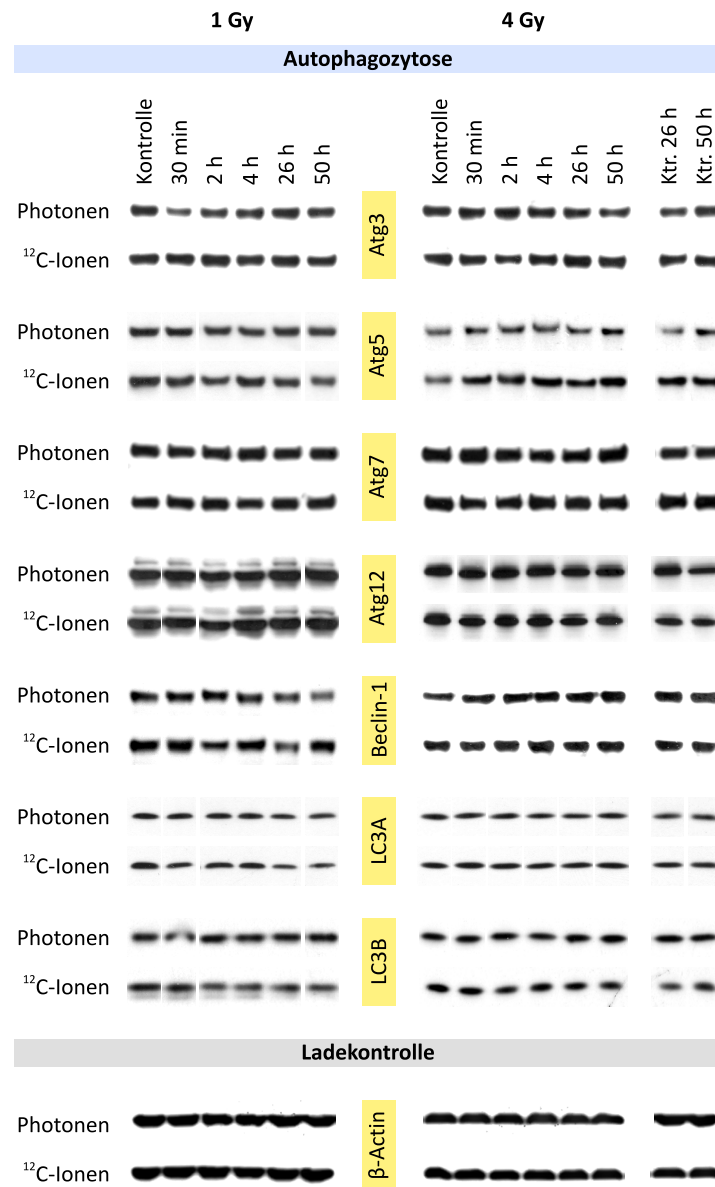


Abbildung 4.23. | Autophagozytose (Western Blots). Auswirkung von ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung auf Atg3, Atg5, Atg7, Atg12, Beclin-1, LC3A und LC3B bei einer Dosis von 1 Gy (links) oder 4 Gy (rechts). Die Blots mit den Antikörpern gegen Atg5 bzw. Atg12 zeigen beide die Bande des Atg5-Atg12 Heterodimers (~55 kDa). Die Bestrahlung rief keine nennenswerten Veränderungen hervor und die Abwesenheit einer Doppelbande bei LC3A und LC3B deutete darauf hin, dass keine Autophagosomen gebildet wurden.

Zusammenfassend ergaben die Western Blots, dass Autophagozytose weder für Photonen-, noch ^{12}C -Ionen-Strahlung eine Rolle bei der Entfaltung der Strahlenwirkung spielte.

4.3. Struktur von DSB-Reparaturfoci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen

Zur genaueren Untersuchung der Struktur von γH2AX Foci nach ^{12}C -Ionen-Bestrahlung wurden an der experimentellen Ionenstrahlanlage SNAKE in Garching Schrägbestrahlungen durchgeführt. Die Ionen wurden dabei unter einem flachen Winkel ($\sim 7^\circ$) gegenüber der Zellebene appliziert, so dass sich die gesamte DSB-Spur des Ionendurchgangs durch den Zellkern mikroskopisch anhand der γH2AX Foci verfolgen ließ. Es wurden Proben von mehreren Zeitpunkten bis 26 h nach Bestrahlung untersucht, um Änderungen in der Größe, Form und Verteilung der Foci während des Reparaturprozesses nachvollziehen zu können. Neben γH2AX wurden außerdem pBRCA1 Foci immunfluoreszent markiert und der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt.

Die Präparate wurden mit einem neuartigen Fluoreszenzmikroskop untersucht, das erstmals Strukturierte Beleuchtung (SIM) und Lokalisationsmikroskopie (SPDM) in einem Gerät vereinte, so dass Aufnahmen der selben Zelle mit beiden superaauflösenden Mikroskopietechniken möglich waren. Die 3-dimensionale Form der Foci und ihre Verteilung im Zellkern wurde anhand der SIM-Aufnahmen untersucht, während die 2D Lokalisationsbilder benutzt wurden, um die Feinstruktur und Molekülverteilung innerhalb der γH2AX Foci zu analysieren.

4.3.1. Im Zeitverlauf zeigen sich primäre und sekundäre DSB-Reparaturfoci

Abbildung 4.24 zeigt optische Schnitte durch ein typisches 3D-SIM-Bild zu jedem untersuchten Zeitpunkt; dieselben Zellen sind in Abbildung 4.24 räumlich dargestellt. Die unbestrahlten Kontrollen wiesen vereinzelte basale γH2AX - und pBRCA1-Signale auf, die im Vergleich zu den bestrahlten Zellen in der Regel schwächer waren, und sich daher gut von den durch die ^{12}C -Ionen induzierten Foci unterscheiden ließen. Bereits $\frac{1}{4}$ h nach Bestrahlung waren sowohl γH2AX , als auch pBRCA1 Foci erkennbar. Neben großen Foci, die sich entlang einer Geraden aufreiheten, und den Weg des Ions durch den Zellkern preisgaben, fanden sich kleine helle Einzelsignale im gesamten Zellkern (ausgenommen Nukleoli). Bei den Einzelsignalen handelte es sich zunächst hauptsächlich um γH2AX -Signale, im Laufe der Zeit traten jedoch immer mehr pBRCA1-Einzelsignale auf, und nach 26 h waren fast alle Einzelsignale pBRCA1-Signale.

Es fiel auf, dass die Foci nach 26 h grundlegend anders im Zellkern verteilt vorlagen, als zu den vorherigen Zeitpunkten: Bis zu 4 h nach Bestrahlung waren sie entlang eines Pfades angeordnet; zwischen $\frac{1}{4}$ h und 1 h handelte es sich um gerade Pfade, nach 2 h kamen vereinzelt leicht gekrümmte Pfade vor, und nach 4 h auch stärkere Krümmungen. Dennoch blieb die ungefähre Flugbahn des für die DSB ursächlichen Ions in jedem Fall nachvollziehbar. Nach 26 h waren die Foci hingegen im gesamten Zellkern verteilt und ihre Anordnung bildete keinen Pfad mehr (siehe Abb. 4.24 und 4.25).

Im Allgemeinen gab es nach Bestrahlung nur moderate zeitliche Veränderungen der mittleren Fokusgrößen, jedoch signifikante Unterschiede bei Betrachtung der größten Foci (siehe 99%-Quantile in Abb. 4.26a und 4.26b). Bis 1 h nach Bestrahlung traten zunehmend größere γH2AX Foci auf (bis $\sim 1.8\mu\text{m}^3$ Volumen und $\sim 34\mu\text{m}^2$ Oberfläche nach 1 h), nach 2 h gab es einen Rückgang, der bei der Oberfläche bis 4 h nach Bestrahlung anhielt, und nach 26 h kam es zu einem erneuten Anstieg von Volumen und Oberfläche. Bei den pBRCA1 Foci war eben-

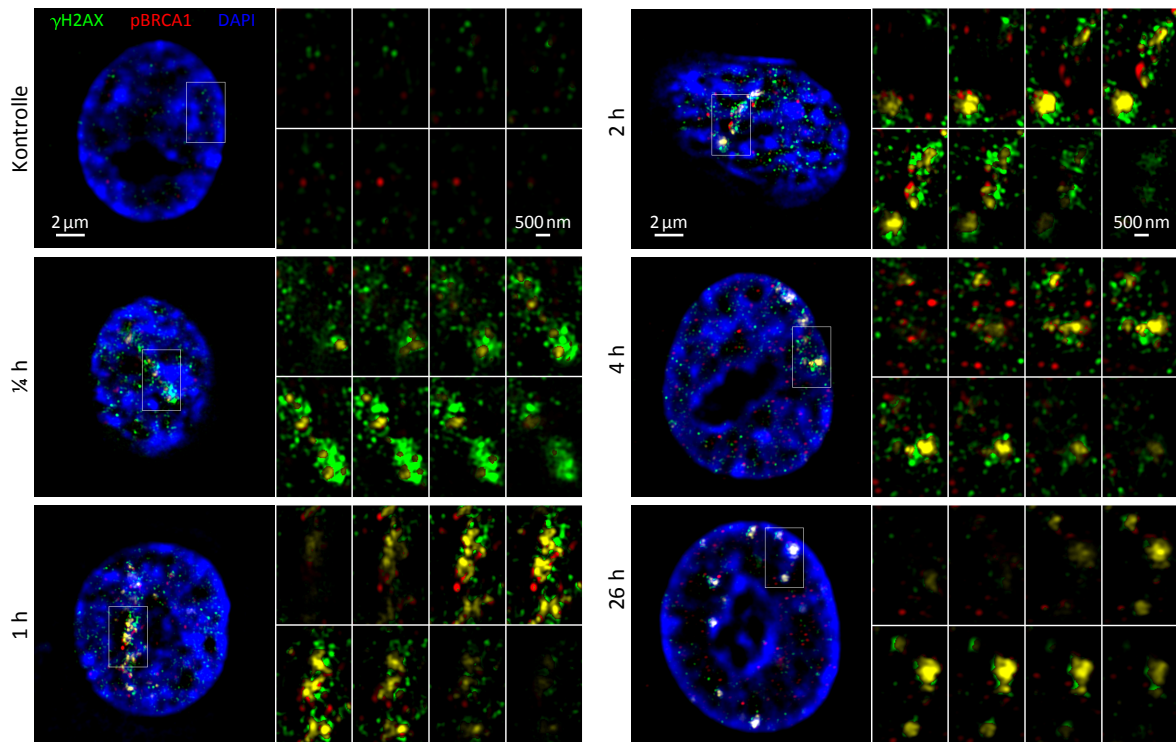


Abbildung 4.24. | Schnittbilder von DSB-Reparaturfoci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf (SIM). Grün: γH2AX , rot: pBRCA1, gelb: Kolokalisation von γH2AX und pBRCA1, blau: DNA (DAPI). Die kleinen Bilder zeigen eine Schnittfolge (in Leserichtung $\Delta z=265\text{ nm}$) an den eingezeichneten Stellen in den großen Bildern mit 2-facher Vergrößerung (zur besseren Übersicht ohne DAPI-Signale).

falls ein zweiphasiges Verhalten zu beobachten: hier kam es nach $\frac{1}{2}\text{ h}$ zum ersten Anstieg großer Foci, der ebenfalls bis 1 h nach Bestrahlung anhielt (Maximalwerte des 99%-Quantils $\sim 0.6\mu\text{m}^3$ Volumen und $\sim 11\mu\text{m}^2$ Oberfläche), und auf den Rückgang nach 2 h folgte ein zweiter Anstieg, bei dem das Maximalvolumen nach 26 h wieder erreicht wurde.

Als Formmaß wurde die Sphärizität der Foci ausgewertet (siehe Abb. 4.26c). Die Sphärizität beschreibt, wie kugelförmig ein Körper ist und nimmt maximal den Wert 1 an (perfekte Kugel). In Übereinstimmung mit der länglichen Gestalt der γH2AX Foci und ihrer stark zerfurchten Struktur, wurden nach Bestrahlung deutlich kleinere Werte beobachtet, als in den Kontrollen. Die mittlere Sphärizität lag zwischen $\frac{1}{4}\text{ h}$ und 2 h bei etwa 0.4 und stieg nach 4–26 h wieder an. Die pBRCA1 Foci zeigten nach Bestrahlung im Mittel kleinere Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Die Verteilung der Sphärizität war im Gegensatz zu den γH2AX Foci asymmetrisch, da die 1%-Quantile besonders tief lagen. Demnach gab es einige pBRCA1 Foci mit weniger sphärischer Gestalt als die des Großteils. Der Verlauf der 1%-Quantile wies darauf hin, dass bis 1 h nach Bestrahlung zunehmend kleinere Sphärizitäten auftraten. Nach 2 h stieg das 1%-Quantil wieder und nach 4–26 h traten erneut weniger sphärische pBRCA1 Foci auf.

Zur Beurteilung des Reparaturvorgangs wurde die Anzahl der γH2AX und pBRCA1 Foci pro Zelle und das aufsummierte Gesamtvolumen der Foci erhoben. Dabei wurden nur Foci berücksichtigt, die ein größeres Volumen aufwiesen, als das entsprechende mittlere Volumen in den Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 zusammengestellt. Die Foci-Anzahl (siehe Abb. 4.27a) zeigte ein zweiphasiges Verhalten mit einem Anstieg ab $\frac{1}{4}\text{ h}$ bis 1 h nach

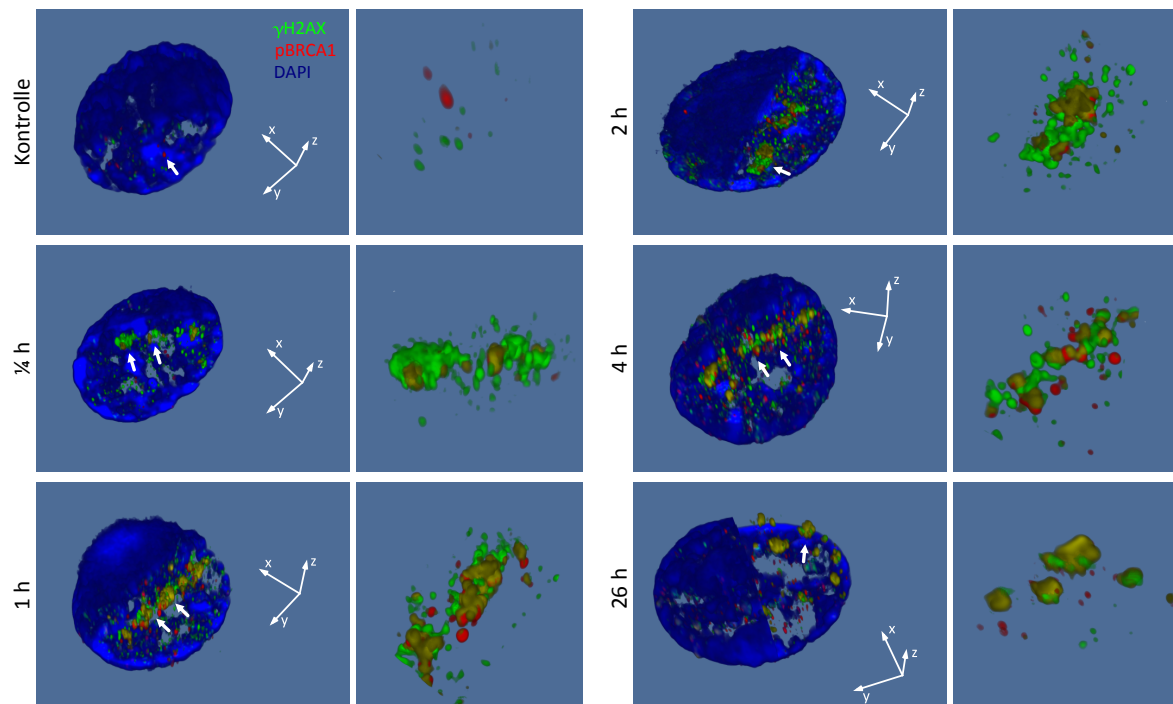


Abbildung 4.25. | 3D Ansichten von DSB-Reparaturfoci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf (SIM). Grün: γH2AX , rot: pBRCA1, gelb: Kolokalisation von γH2AX und pBRCA1, blau: DNA (DAPI). **Links:** Übersichtsbilder (die Zellkerne sind angeschnitten dargestellt, um den Blick auf die Reparaturfoci freizugeben). **Rechts:** Vergrößerung der mit Pfeilen gekennzeichneten Foci (ohne DAPI-Signale).

Bestrahlung, einem Abfall nach 2 h und einem erneuten Anstieg nach 4–26 h. Auf dem Höhepunkt des ersten Anstiegs nach 1 h wurden durchschnittlich 22.8 γH2AX und 35.2 pBRCA1 Foci gezählt. Nach 26 h lag der Durchschnitt mit 36.7 γH2AX und 64.3 pBRCA1 Foci deutlich höher. Der Verlauf des Gesamtvolumens (siehe Abb. 4.27b) ähnelte dem der Anzahl, wobei die durchschnittlich größeren γH2AX Foci höhere Werte erreichten.

Des Weiteren wurde der Kolokalisationsgrad von γH2AX und pBRCA1 Foci untersucht (siehe Abb. 4.28). Dabei wurden nur Zellen berücksichtigt, die pBRCA1 Foci aufwiesen (dies traf auf 83% aller aufgenommenen bestrahlten Zellen zu). Der *Pearson Koeffizient* (siehe Abb. 4.28a) ist ein Korrelationsmaß für die gegenseitige Überlappung beider Proteine [184]. Bei vollständiger Überlagerung (identische Bilder) nimmt er den Wert 1 an¹, bei vollständigem Ausschluss -1 . Hier konnten auf Grund der Größenunterschiede zwischen γH2AX und pBRCA1 Foci nur Teilüberlappungen vorkommen, weshalb der Pearson Koeffizient stets relativ kleine Werte über Null (keine Korrelation) annahm. Dennoch zeigte sich im Zeitverlauf ein Trend, der die rein optische Beurteilung bestätigte: Demnach folgte der Kolokalisationsgrad einem ähnlichen zweiphasigen Verlauf, wie er bereits für das Gesamtvolumen der Foci und weitere Parameter beschrieben wurde (vgl. Abb. 4.27).

Betrachtet man statt der volumenbezogenen Kolokalisation den mengenmäßigen Prozentsatz kolokalisierter Foci (Summe der γH2AX Foci, deren Schwerpunkt sich innerhalb eines BRCA1 Fokus befindet und der BRCA1 Foci, deren Schwerpunkt sich innerhalb eines γH2AX

¹vorausgesetzt, beide Bilder haben die selbe Intensität; hier war dies der Fall, da Binärmasken der Foci für die Kolokalisationsmessungen verwendet wurden.

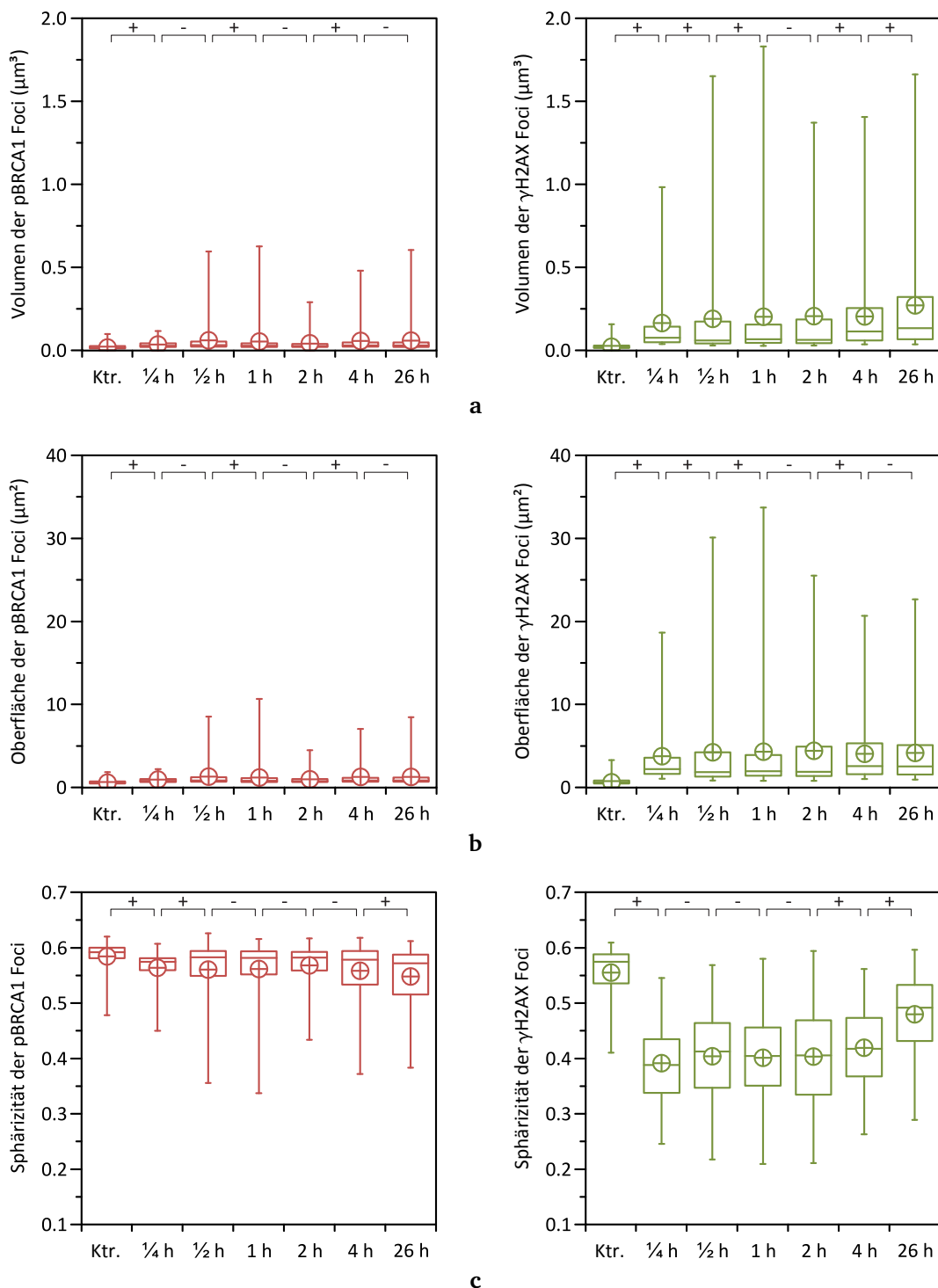
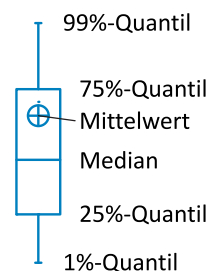


Abbildung 4.26. | Größe und Form von γ H2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf. (a) Volumen, (b) Oberfläche, (c) Sphärizität. Links sind die Graphen zu den pBRCA1 Foci dargestellt (rot), rechts die der γ H2AX Foci (grün). Gezeigt sind die Messwert-Verteilungen in Form von Box-Plots mit den nebenstehend abgebildeten Quantilen und dem arithmetischen Mittelwert. Mit + gekennzeichnete Verteilungspaare unterschieden sich signifikant voneinander, mit - gekennzeichnete nicht (Kolmogorov-Smirnov Test auf Gleichheit zum Signifikanzniveau von 0,05).



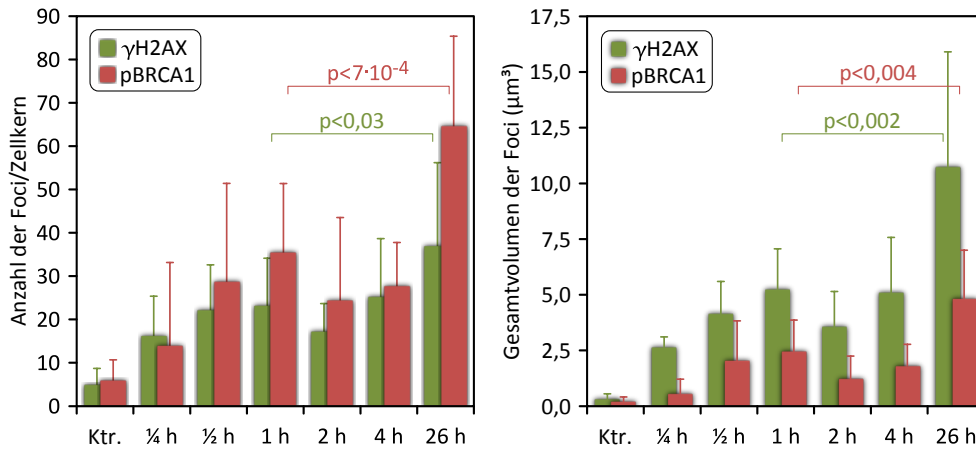


Abbildung 4.27. | Eigenschaften der γ H2AX und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf. (a) Anzahl, (b) Gesamtvolumen und (c) Gesamtoberfläche. Berücksichtigt wurden alle Foci eines Zellkerns mit einem größeren Volumen als dem mittleren Volumen in den unbestrahlten Kontrollen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte aller Aufnahmen, die Fehlerbalken ihre Standardabweichungen. Nach 26 h waren die Mittelwerte signifikant gegenüber dem Maximum der primären Reparaturantwort 1 h nach Bestrahlung erhöht (t-Tests gemäß Abschnitt 2.6).

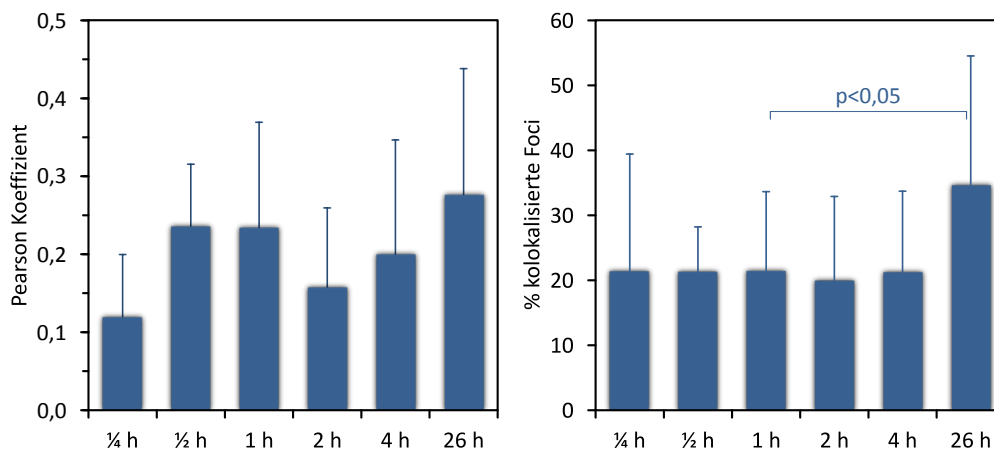


Abbildung 4.28. | Kolokalisation von γ H2AX- und pBRCA1 Foci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf (SIM). (a) Pearson Korrelationskoeffizient, (b) prozentualer Anteil kolokalisierter Foci. Die Säulen zeigen die Mittelwerte aller Aufnahmen, die Fehlerbalken ihre Standardabweichungen. Nach 26 h war der prozentuale Anteil der kolokalisierten Foci signifikant gegenüber dem Maximum der primären Reparaturantwort nach 1 h erhöht (t-Tests gemäß Abschnitt 2.6).

Fokus befindet, geteilt durch die Anzahl aller Foci), so ergibt sich ein etwas anderes Bild (siehe Abb. 4.28b): Bis 4 h nach Bestrahlung schwankten die Werte nur geringfügig um einen Durchschnitt von $\sim 21\%$, während nach 26 h ein signifikant höherer Kolokalisationsgrad gemessen wurde ($\sim 35\%$).

Insgesamt wiesen die Daten auf eine primäre und eine sekundäre Strahlenantwort hin. Primär entwickelten sich DSB-Reparaturfoci entlang der Ionenflugbahn durch den Zellkern, die nach 1 h ihre volle Ausprägung erreichten, und sich nach 2 h wieder zurückbildeten.

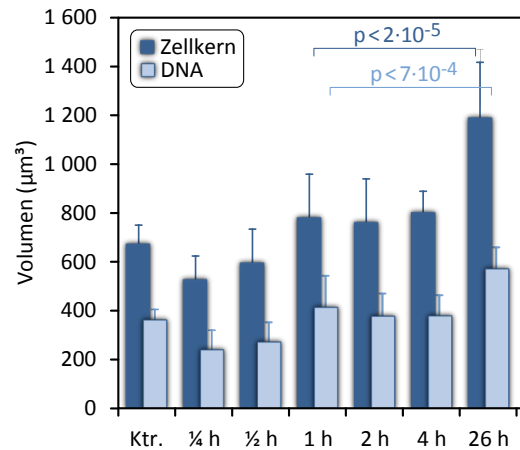


Abbildung 4.29. | Zellkern- und DNA-Volumen nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen. Zur Berechnung des DNA-Volumens wurden die entfalteten DAPI-Aufnahmen unter Verwendung eines Intensitätsschwellwerts in eine 3-dimensionale Maske mit DAPI-positivem Volumen konvertiert. Das Zellkernvolumen wurde aus der konvexen Hülle um diese Maske berechnet. Die Säulen zeigen die Mittelwerte aller Aufnahmen, die Fehlerbalken ihre Standardabweichungen. Nach 26 h gab es signifikante Erhöhungen gegenüber den Werten nach 1 h (t-Tests gemäß Abschnitt 2.6).

Im Vergleich zu den pBRCA1 Foci bauten sich die γH2AX Foci schneller auf (Anstieg des Volumens nach $\frac{1}{4}$ h gegenüber $\frac{1}{2}$ h), erreichten im Durchschnitt das 3- bis 4-fache Volumen und wiesen eine geringere Sphärizität auf, was sich sowohl auf die länglichere Gestalt, als auch die zerklüfteter Struktur der γH2AX Foci zurückführen ließ. Bei der Anzahl überwogen die pBRCA1 Foci $\frac{1}{2}$ h nach Bestrahlung um 54%.

Nach 4 h begann die sekundäre Strahlenantwort mit einer leichten Zunahme der Anzahl und Größe der γH2AX und pBRCA1 Foci. Nach 26 h wiesen die Zellen schließlich etwa 1.6 mal mehr γH2AX Foci und 1.8 mal mehr pBRCA1 Foci auf als auf dem Höhepunkt der primären Strahlenantwort nach 1 h. Bezogen auf das Gesamtvolumen pro Zelle ergab sich für beide Fociarten eine Verdopplung. Außerdem fielen 26 h nach Bestrahlung Unterschiede in der Verteilung, der Form und der Struktur der Foci gegenüber den früheren Zeitpunkten auf, und der Grad der Kolo-kalisation zwischen γH2AX und pBRCA1 Foci war besonders hoch.

BRCA1 hat neben seiner Funktion als DSB-Reparaturenzym auch regulatorische Bedeutung für die Einleitung von Zellzyklusblockaden am G2/M-Übergang. Interessanterweise zeigte sich bei der Auswertung der DAPI-Aufnahmen ein signifikant erhöhtes Zellkernvolumen und des DNA-Volumens nach 26 h, der auf einen G2/M-Arrest schließen ließ (siehe Abb. 4.29). Umgekehrt waren beide Werte bis $\frac{1}{2}$ h nach Bestrahlung niedriger als in den unbestrahlten Kontrollen und wiesen auf eine mögliche Blockade am G1/S-Übergang hin.

4.3.2. Foci Substruktur

Um einen detaillierteren Einblick in die innere Struktur der γH2AX Foci zu erlangen, wurden optische Schnitte der 3D-SIM Aufnahmen und die durch SPDM erhaltenen Lokalisationsdaten ausgewertet (siehe Abb. 4.30). Die optischen Schnitte zeigten, dass die Foci im Inneren nicht homogen aufgebaut waren, sondern aus mehreren Subfoci bestanden. In den SIM-Bildern stellten sich diese Subfoci als gewundene längliche Strukturen dar, die teilweise wie Ketten von dicht aneinandergereihten runden Objekten aussahen. Durch die Überlagerung

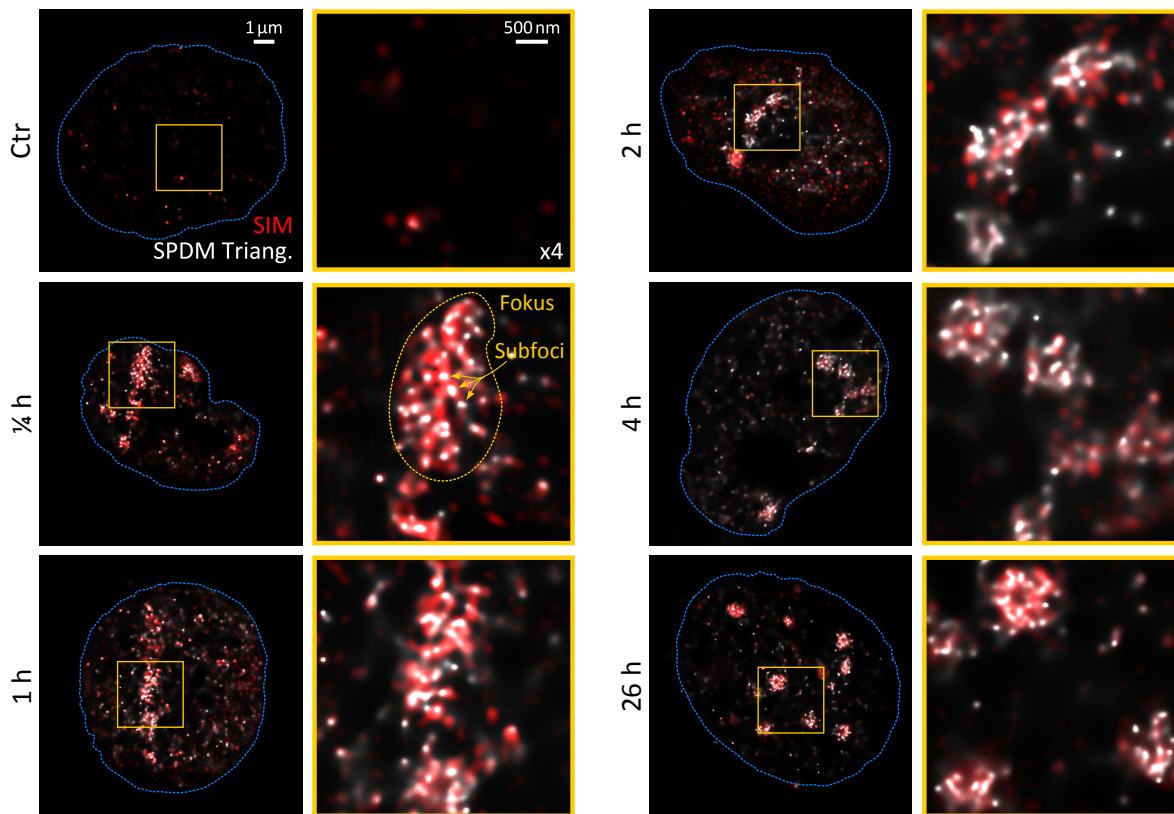


Abbildung 4.30. | *Innere Struktur der γ H2AX Foci.* SPDM Triangulationsbilder (weiß) wurden mit der entsprechenden Ebene im 3D-SIM-Bild (rot) überlagert. Neben den gesamten Zellkernen (blau umrandet) sind 4x vergrößerte Ansichten der gelb eingerahmten Regionen abgebildet. Die höhere laterale Auflösung der SPDM-Bilder enthüllte einige Strukturdetails, die mit SIM nicht aufgelöst werden konnten.

mit den SPDM-Bildern konnten viele Abschnitte dieser Ketten noch feiner aufgelöst werden und es erhärtete sich der Eindruck, dass die γ H2AX Foci aus Ketten von mehr oder weniger runden Subfoci aufgebaut sind.

Die Zusammensetzung der Foci aus vielen einzelnen Subfoci erklärt die zerfurchte Oberfläche der Primärfoci in den 3D-SIM-Bildern. Die nach 26 h vorhandenen Sekundärfoci bestanden ebenfalls aus mehreren Subfoci, die den primären glichen, jedoch durch ihre kreisrunde Anordnung zu einer glatteren Focioberfläche führten. Zur quantitativen Charakterisierung der Subfoci wurden Clusteranalysen anhand der SPDM Positionsinformationen durchgeführt. Zur Definition der Subfoci wurde ein Schwellwert gesetzt, der die minimale lokale Signaldichte vorgibt. Um Artefakte zu vermeiden, wurden die Daten mit Zufallsverteilungen von Signalen mit gleicher mittlerer Dichte verglichen. Der Schwellwert wurde so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit von Zufallsclustern unter 0,5% betrug. Eine Analyse der Signaldistanzen zeigte eindeutige Unterschiede zwischen den Originaldaten und den Zufallsverteilungen (siehe Abb. A.1 im Anhang unter A.3). Die Vorgehensweise lieferte eine gute Übereinstimmung der Cluster (im Folgenden Subfoci genannt) mit den offensichtlichen Strukturen in den SIM- und SPDM-Triangulationsbildern (siehe Abb. 4.31a). Wie in den SIM-Bildern, traten auch außerhalb der Ionenspur, bzw. außerhalb der Foci, vereinzelt kleine Subfoci auf. Um diese von den Subfoci innerhalb der Foci zu unterscheiden, wurden die Foci-Regionen basierend auf den SIM-Bildern markiert. Abbildung 4.31b zeigt die unterschiedliche Dichte

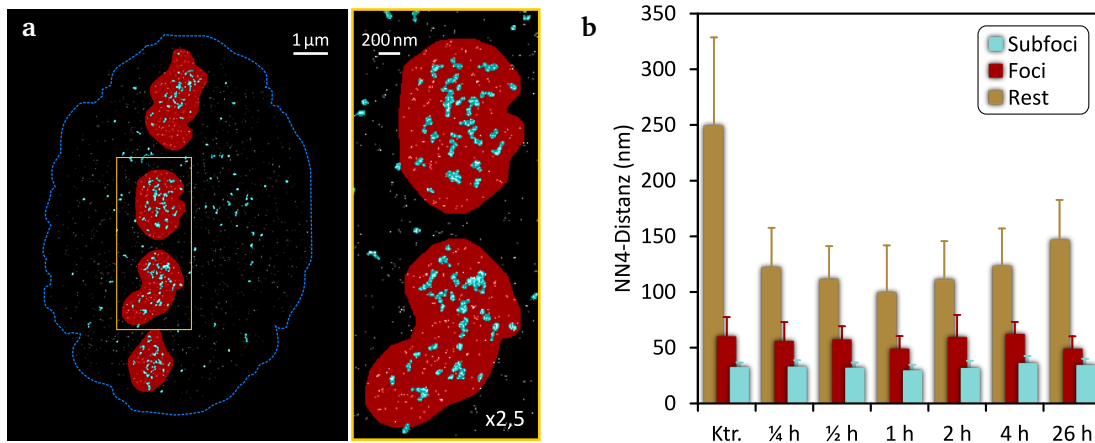


Abbildung 4.31. | SPDM-basierte Clusteranalyse der γ H2AX-Signale. (a) SPDM-Bild einer U87 Zelle 30 min nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen. **Links:** gesamter Zellkern (blau umrandet anhand DAPI Bild). **Rechts:** 2,5x vergrößerte Ansicht der gelb eingerahmten Region. Die Signale wurden in Subfoci (blau), Foci (Subfoci-Cluster, rot) und Restsignale (Graustufen) eingeteilt. (b) Mittlere Distanzen zu den nächsten 4 Nachbarsignalen (NN4-Distanzen) in Subfoci, Foci und Restsignalen.

der Signale in den Foci, den Subfoci und dem restlichen Zellkern anhand der mittleren Distanz zu den nächsten 4 Nachbarn (NN4-Distanz). Die Subfoci wiesen zu allen Zeitpunkten eine konstante mittlere NN4-Distanz von $32,6 \pm 2,1$ nm auf. In den Foci-Regionen betrug die NN4-Distanz durchschnittlich $56,5 \pm 5,3$ nm und die restlichen Signale wiesen NN4-Distanzen größer 100 nm auf (in den unbestrahlten Kontrollen sogar ~ 250 nm).

Nachfolgend wurde untersucht, wie sich die Eigenschaften der Subfoci innerhalb und außerhalb der Foci im Zeitverlauf verhielten. Die Anzahl der Subfoci pro Zellkern (siehe Abb. 4.32a) veränderte sich zeitabhängig und zeigte ein ähnliches biphasisches Verhalten wie bereits für die Focianzahl beschrieben. Nach 1 h Reparaturzeit erreichte die durchschnittliche Subfocianzahl ihren ersten Spitzenwert (93 innerhalb und 114 außerhalb der Foci). Auf den anschließenden Abfall folgte ein erneuter Anstieg der Subfocianzahl nach 26 h. Bei genauere Betrachtung zeigte sich, dass dieser Anstieg auf Subfoci innerhalb der Foci beschränkt war. Dies stimmte mit der Beobachtung überein, dass nach 26 h vergleichsweise wenige kleine Einzelsignale außerhalb der Foci in den 3D-SIM-Aufnahmen vorhanden waren. Die hohe Varianz in der Messung der Subfocianzahl hängt vermutlich mit der Auswahl der optischen Schnittebene zusammen, die bei SPDM besonders dünn ist.

Zur Abschätzung der Subfocigröße wurde ein flächenäquivalenter Kreisdurchmesser berechnet² (siehe Abb. 4.32b). Der Durchmesser der Subfoci war innerhalb der Foci ($113,3 \pm 9,4$ nm) größer als außerhalb ($90,1 \pm 5,2$ nm) und veränderte sich kaum während der Reparaturzeit. Mit der mittleren Signalanzahl der Subfoci (Abb. 4.32c) verhielt es sich ähnlich ($8,3 \pm 0,7$ innerhalb und $6,3 \pm 0,3$ außerhalb der Foci). Aufgrund der unbekanntenen Markierungs- und Detektionseffizienz ist diese Angabe nur ein relatives Maß für die Anzahl der γ H2AX-Moleküle pro Subfokus. Als Formmaß der Subfoci wurde ihre Zirkularität berechnet³. Die Zirkularität ist eine Maß für die Ähnlichkeit einer Fläche mit einem Kreis.

²der flächenäquivalente Kreisdurchmesser berechnet sich gemäß $\sqrt{4 \cdot \text{Fläche} / \pi}$.

³die Zirkularität wurde gemäß $4\pi(\text{Fläche}/\text{Umfang}^2)$ berechnet. Aufgrund der Pixelgeometrie können Kreise in digitalen Bildern nur angenähert werden und besitzen eine kleinere Zirkularität als 1. Dies wurde berücksichtigt, indem die Zirkularität der Subfoci auf die eines Kreises mit flächenäquivalentem Durchmesser normiert wurde.

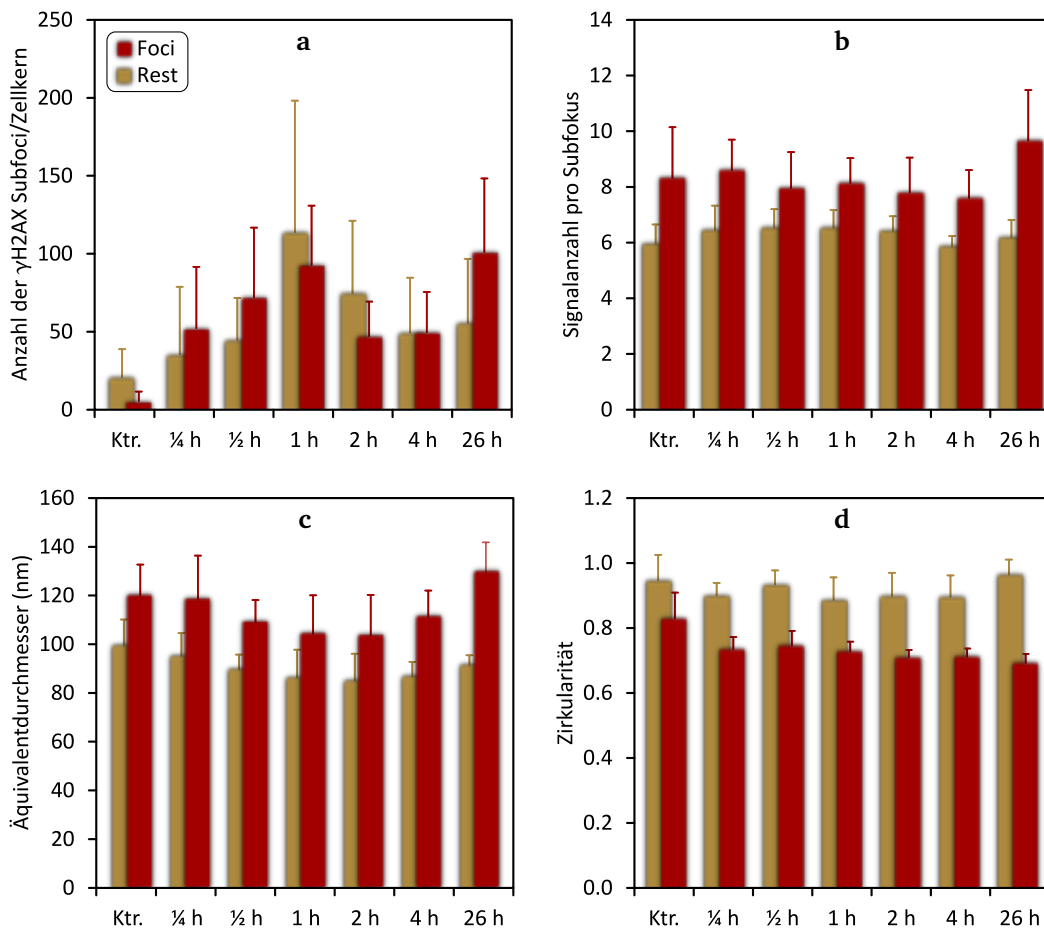


Abbildung 4.32. | Eigenschaften der γ H2AX Subfoci nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen im Zeitverlauf (SPDM). (a) Anzahl der Subfoci pro Zellkern, (b) Signalanzahl pro Subfokus, (c) flächenäquivalenter Kreisdurchmesser, (d) Zirkularität. Von jedem Zellkern wurde der Median des jeweiligen Parameters berechnet. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen davon für die Subfoci innerhalb der Foci und im restlichen Zellkern.

Ein perfekter Kreis hat den Wert 1, abweichende Formen ergeben kleinere Werte. Aufgrund der länglicheren Gestalt der Subfoci innerhalb der Foci-Regionen, wiesen diese eine kleinere Zirkularität auf als die Subfoci im restlichen Zellkern (siehe Abb. 4.32d). Im Zeitverlauf zeigte sich, dass die Zirkularität innerhalb der Foci tendenziell immer weiter absank (von 0,83 in den Kontrollen 0,69 nach 26 h), während die Subfoci im restlichen Zellkern annähernd kreisrund blieben. Wegen der länglichen Gestalt der Subfoci in den Foci darf der äquivalente Kreisdurchmesser nicht mit der Dicke der Struktur verwechselt werden. Anhand von Stichproben wurde die Dicke einiger besonders länglicher Subfoci auf ca. 40–60 nm abgeschätzt (nicht abgebildet).

Die pBRCA1 Foci, die nur im SIM-Modus aufgenommen wurden, wiesen ebenfalls Subfoci auf, die jedoch schwerer voneinander zu unterscheiden waren. Verglichen mit den γ H2AX Subfoci war ihre Anzahl geringer und sie schienen größer zu sein; hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die Auflösung bei der pBRCA1-Detektion entsprechend der längeren Emissionswellenlänge des verwendeten Fluorophors (629 gegenüber 528 nm) geringer war.

Bei der Strahlenbehandlung von Tumoren bietet die Strahlentherapie mit ^{12}C -Ionen gegenüber der konventionellen Therapie mit Photonen physikalische und biologische Vorteile. Schwerionen ermöglichen eine bessere physikalische Dosisverteilung in den Tumoren und haben bei gleicher Dosis eine erhöhte biologische Wirksamkeit. Am Anfang dieser Arbeit stand die Frage nach dem Grund für die erhöhte relative biologische Wirksamkeit (RBW) von ^{12}C -Ionen-Strahlung. Die RBW für den Endpunkt „Reduktion des klonogenen Überlebens“ lag beispielsweise bei U87 Glioblastomzellen im klinisch relevanten Dosisbereich von 1–3 Gy zwischen 2 und 3. Bei gleicher physikalischer Strahlendosis tragen Photonen und ^{12}C -Ionen gleich viel Energie in die Zelle ein, so dass gleich viele Ionisierungen möglich sind, die zu DNA-Schäden führen. Die Art dieser Schäden und ihre Wirkungen können sich jedoch erheblich unterscheiden.

Maßgeblich für das Überleben der Zelle sind DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), da sie die schwerwiegendsten Strahlenschäden darstellen. Die Untersuchungen der DSBs in U87 Zellen anhand des DSB-Markers γH2AX deuteten darauf hin, dass nicht die bloße Anzahl der DSBs, sondern ihre dichte Clusterung mit der erhöhten Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen-Strahlung assoziiert ist. Zudem zeigte sich, dass die Wirkung der ^{12}C -Ionen weniger stark von der Zellzyklusphase abhängt als bei Photonenstrahlung. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf stärker geclusterte DSBs bei ^{12}C -Ionen-Strahlung zurückzuführen, da deren Reparatur in größerem Maße von der homologen Rekombination abhängig ist.

Um die Erscheinung der DSB-Reparaturfoci auf DNA-Ebene visualisieren und quantifizieren zu können, sind optische Methoden der supraauflösenden Mikroskopie im Kontext der Schwerionenbiologie zum Einsatz gekommen, die aufgrund ihrer wesentlich höheren Auflösung eine neue Perspektive bei der Untersuchung chromosomaler Strukturen bieten. Hierbei zeigte sich insbesondere, dass ^{12}C -Ionen-induzierte γH2AX Foci aus vielen kleineren Subfoci bestehen. Diese Subfoci wiesen eine Ausdehnung in der Größenordnung von 100 nm auf und hatten teilweise eine längliche Gestalt, die vermutlich durch die lokale Chromatinstruktur an den DSB Schadensstellen vorgegeben wurde. Nach dem Abklingen der Primärfoci konnte eine zweite Welle von DSB-Reparaturfoci beobachtet werden. Die Sekundärfoci unterschieden sich in mehreren Aspekten von den Primären und wiesen auf eine replikationsbedingte Entstehung hin.

5.1. DSBs, γH2AX und relative Wirksamkeit

Zur Untersuchung der Effekte von ^{12}C -Ionen-Strahlung im Vergleich zu Photonenstrahlung wurden U87 Glioblastomzellen am Heidelberger Ionentherapiezentrum mit 1,2–2,4 GeV ^{12}C -Ionen oder am Deutschen Krebsforschungszentrum mit 6 MV Photonen bestrahlt. Zunächst wurden Dosis-Wirkungs-Versuche zur RBW-Bestimmung der ^{12}C -Ionen durchgeführt. Hinsichtlich der Reduktion des klonogenen Überlebens zeigten die Ionen eine 2,6–3,0-fach

stärkere Wirkung als Photonen bei gleicher physikalischer Dosis (in $\text{Gy}=\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$) und Überlebensraten zwischen 50 und 10%.

Um die Ursachen für die unterschiedliche Wirksamkeit zu beleuchten, wurde die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch Immunfluoreszenz-Nachweis von γH2AX untersucht. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) wurde die Induktion des DSB-Markers 30 min nach Bestrahlung in den verschiedenen Zellzyklusphasen gemessen. Die Messungen ergaben lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen 0,5 und 8 Gy und wiesen auf eine überproportional große Wirkung der ^{12}C -Ionen unterhalb von 0,5 Gy hin. Gegenüber Photonenstrahlung war die relative dosisäquivalente Wirkung der ^{12}C -Ionen (Wirkungsverhältnis ^{12}C -Ionen/Photonen bei gleicher Dosis) bei 1 Gy ($\text{RDW}_{1\text{Gy}}$) daher größer als bei 4 Gy ($\text{RDW}_{4\text{Gy}}$). In der gesamten Zellpopulation betrug die $\text{RDW}_{1\text{Gy}}$ 2,6 und die $\text{RDW}_{4\text{Gy}}$ 1,8.

Im Vergleich zwischen den Zellzyklusphasen reagierten die Zellen in der M-Phase am sensibelsten auf die Bestrahlung (größte Steigung der Regressionsgeraden) und der Einfluss der Strahlenart war am geringsten (RDW-Werte nahe 1). Gegenüber der M-Phase war die Strahlenempfindlichkeit in den übrigen Zellzyklusphasen geringer. Bei ^{12}C -Ionen-Strahlung unterschied sie sich nur geringfügig zwischen G1, S- und G2-Phase, während bei Photonenstrahlung größere Unterschiede auftraten, die zu unterschiedlich hohen RDW-Werten führten. In der S-Phase war die relative Wirksamkeit der ^{12}C -Ionen am größten und die Zellen zeigten die geringste Sensitivität gegenüber Photonenstrahlung, gefolgt von der G2- und der G1-Phase. Die Ergebnisse zeigten, dass die Strahlenwirkung bei ^{12}C -Ionen weniger stark von der Zellzyklusphase abhängt, als bei Photonen.

Um zu verstehen, wieso die Wirkung der ^{12}C -Ionen weniger von der Zellzyklusphase abhängt, stellte sich zunächst die Frage, warum Photonenstrahlung in den verschiedenen Phasen unterschiedlich stark wirkt. Die Unterschiede in der γH2AX -Induktion lassen mindestens zwei Interpretationen zu: entweder die Anfälligkeit der DNA für DSBs unterscheidet sich Zellzyklus-abhängig, oder die Zellen reagieren in den einzelnen Phasen unterschiedlich stark/schnell auf die DSBs. Die relativ geringe Sensitivität von S-Phase-Zellen gegenüber Photonenstrahlung wird häufig darauf zurückgeführt, dass die DNA-Reparatur besonders aktiv ist und die offene Chromatinstruktur während der Replikation eine schnelle und effektive Schadensbehebung fördert [189,190]. Zellzyklus-abhängige Unterschiede im Chromatinstatus nehmen vermutlich sowohl auf die Bruchwahrscheinlichkeit, als auch die Kinetik der Strahlenantwort Einfluss [191–193].

Eine höhere Packungsdichte der DNA erhöht theoretisch die Effizienz der Bruchinduktion, da dies die Trefferquote erhöht [194]. Im Gegensatz dazu schützt ein höherer Proteingehalt im Chromatin die DNA wie eine Abschirmung. Untersuchungen auf der Basis der Pulsfeld-Gelelektrophorese belegen, dass ionisierende Strahlung mehr Strangbrüche erzeugt, wenn die Chromatinproteine entfernt werden [195,196]. Basierend auf der Zahl der γH2AX Foci legen weitere Studien nahe, dass die DSB-Anfälligkeit im Heterochromatin aufgrund des höheren Proteinanteils geringer ist als im Euchromatin [197]. Diese Interpretation setzt allerdings voraus, dass sich die γH2AX Foci in Hetero- und Euchromatin mit gleicher Effizienz bilden und detektieren lassen. Aufgrund der verminderten Zugänglichkeit des Heterochromatins erscheint dies fraglich, denn dies erschwert sowohl die H2AX-Phosphorylierung in vivo, als auch die Bindung des γH2AX -Antikörpers in vitro. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass DSBs im Heterochromatin durch lokale Chromatinumlagerungen zum Euchromatin hin verschoben werden, bevor sie effizient repariert werden [198–201].

Bei der mikroskopischen Auszählung der γ H2AX Foci zeigte sich ein Sättigungseffekt bei Dosen oberhalb von 2 Gy, obwohl die γ H2AX-Konzentration (Fluoreszenzintensität) wie bei den FACS-Auswertungen weiterhin linear mit der Dosis anstieg. Die Sättigung trat unabhängig von der Strahlenart auf, wobei die maximale Focianzahl bei Photonen größer war als bei ^{12}C -Ionen. Auch unterhalb der Sättigungsdosis verursachten Photonen mehr Foci als ^{12}C -Ionen. Dies ist ein typisches Ergebnis, das in der Literatur bereits für verschiedene Zelllinien beschrieben wurde [202]. Glaubt man der These dass 1 γ H2AX Fokus genau einem DSB entspricht [63], hieße dies, dass ^{12}C -Ionen weniger DSBs verursachen als Photonen gleicher Dosis. Tatsächlich vertritt eine Studie zur Wirkung von ^{12}C -Ionen-Strahlung in Fibroblasten diese Annahme [203], wobei der Premature Chromosome Condensation Assay [204] zur Quantifizierung von Chromosomenbrüchen verwendet wurde. Die erhöhte RBW der ^{12}C -Ionen wird hierbei einer unterschiedlichen Qualität der Schäden zugeschrieben: die Komplexität und Reparaturanforderung der ^{12}C -Ionen-Schäden soll größer sein als bei Photonen. Die Autoren sind der Ansicht, dass dies auf eine stärkere Clusterung der DSB-Schäden zurückzuführen sei.

Neben reinen DSB-Clustern können auch geclusterte Nicht-DSB-Schäden und Mischformen von DSBs und anderen Schäden die DNA-Reparatur erschweren [20,23,24,205]. Zuweilen werden komplexe DSBs in der Literatur als eigenständige Schadenform betrachtet und getrennt von einfachen DSBs behandelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Frage der DSB-Anzahl getrennt von ihrem verteilungsbedingten Komplexitätsgrad betrachtet. Frühe Experimente zur Wirkung von Schwerionenbestrahlung, die auf der Pulsfeld-Gelelektrophorese oder dem Comet-Assay [206] basierten, ergaben einen höheren Anteil kleiner DNA-Fragmente im Vergleich zu Photonenstrahlung, ein Indiz, das für multiple DSBs in räumlicher Nähe spricht [196]. Allerdings erforderten diese Methoden sehr hohe Strahlendosen und sind nicht in der Lage, DSBs von Einzelstrangbrüchen zu unterscheiden.

γ H2AX Foci sind recht große Strukturen, die sich über mehrere Mbp im Chromatin erstrecken [44]. Entsprechend können sie keine DSBs auflösen, die innerhalb dieser Größenordnung beieinander liegen [207] Hinzu kommt, dass die Anzahl der γ H2AX Foci durch den Vorrat an H2AX Molekülen und deren Verteilung innerhalb des Chromatins begrenzt wird. Verschiedene Zelllinien weisen mitunter einen sehr unterschiedlichen H2AX-Gehalt auf, der in Säugerzellen zwischen 2 und 25% pro H2A-Histon (entsprechend 1–12,5% pro Nukleosom) schwankt [39]. Es gibt also eine biologisch bedingte Obergrenze für die Anzahl der γ H2AX Foci. Zusätzlich muss die messtechnische Limitation beim Zählen der Foci berücksichtigt werden: liegt der Abstand zweier Foci unterhalb der optischen Auflösung des Mikroskops, so können sie nicht getrennt erfasst werden [200,208].

Im vorliegenden Fall wies die Häufigkeitsverteilung der Focianzahl nicht auf die Überschreitung einer Messgrenze bei Dosen >2 Gy hin. Außerdem änderte sich die Größe der Foci (mittlere Fokusfläche) oberhalb von 2 Gy nicht wesentlich. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass der Sättigungseffekt der Focianzahl ausschließlich auf Unterscheidungsprobleme von räumlich überlagerten Foci zurückzuführen ist. Eine Erschöpfung des H2AX-Vorrats ist hingegen auszuschließen, da für beide Strahlenarten keine Sättigung bei der γ H2AX-Intensität vorlag, und außerdem im Mittel nur 30% der Zellkernfläche von γ H2AX Foci eingenommen wurde. Eine mögliche Erklärung für die Sättigung der Focianzahl und -größe trotz linear mit der Dosis steigender Intensität wäre, dass die Bruchanfälligkeit der DNA in der Nähe eines DSBs steigt. Bei höheren Dosen würden dann bevorzugt komplexe DSBs ent-

stehen, die zwar die Intensität der Foci erhöhen, jedoch keine neuen erzeugen, wie es bei isolierten DSBs der Fall wäre.

Bemerkenswert ist, dass ^{12}C -Ionen im Vergleich zu Photonen zwar weniger, dafür aber größere γH2AX Foci hervorbrachten, so dass sich bei gleicher Dosis in der Summe gleich große Gesamtflächen der Foci pro Zellkern ergaben. Dies könnte bedeuten, dass ^{12}C -Ionen vergleichbar viele DSBs induzieren wie Photonen, die jedoch dichter geclustert sind. In diesem Fall ließe sich die stärkere biologische Wirkung der ^{12}C -Ionen allein auf die Schadenskomplexität zurückführen. Laut [202] besteht ein Zusammenhang zwischen dem LET, der Bruchkomplexität und der Größe der γH2AX Foci. Aufgrund der hier gemessenen höheren γH2AX -Intensität durch ^{12}C -Ionen bestehen jedoch Zweifel an der Gleichheit der DSB-Anzahl im Vergleich zur Photonenbestrahlung; die DSB-Anzahl könnte bei ^{12}C -Ionen zusätzlich zur Dichte der Schäden erhöht sein und einen Teil der biologischen Wirkung ausmachen. Ältere Messungen der DSB-Anzahl mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese weisen ebenfalls darauf hin, dass sowohl die Clusterdichte, als auch die Gesamtanzahl an DSBs mit zunehmendem LET ansteigen [209].

Neben der direkten Induktion geclustelter DSBs könnte auch eine schnelle Relokation von DSBs über Distanzen von 1–2 μm in „Reparaturzentren“ zur Entstehung großer γH2AX Foci und dem Sättigungseffekt in der Focianzahl beitragen [210,211]. Die Existenz solcher Reparaturzentren ist jedoch umstritten [212]. Die Hypothese der Reparaturzentren stützt sich primär auf die Beobachtung, dass entlang der Flugbahn einzelner Schwerionen große Lücken zwischen den DSB-Reparaturfoci liegen, obwohl aufgrund des hohen LETs auch dort DSBs entstehen müssten [213]. Mikroskopische Untersuchungen zur Beweglichkeit von DSB-Reparaturfoci sprechen gegen eine generelle Verschiebung von DSBs [214]. Tatsächlich zeigen die meisten Foci eine hohe Ortsstabilität mit subdiffusivem Charakter [215]. Auf heterochromatische DSBs scheint dies jedoch nicht zuzutreffen. Stattdessen mehren sich die Hinweise darauf, dass heterochromatische DSBs gezielt an die Grenze zum Euchromatin umgelagert werden [199,200,202]. Obwohl dies nicht zwingend eine gezielte „Sammlung“ der DSBs im Sinne der Reparaturzentren bedeutet, könnte es dennoch die zufällige Vereinigung mehrerer Reparaturfoci fördern.

Unabhängig von der Frage, warum heterochromatische DSBs verlagert werden, liegen Verschiebungen von 1–2 μm in der Größenordnung und Beweglichkeit ganzer Chromosomenterritorien [216,217]. Bei solch weiträumigen Verlagerungen der DSBs besteht die Gefahr, dass zusammengehörige Bruchenden verloren gehen und Translokationen zur Folge haben [218]. Auch dieser Aspekt ist bei geclusterten DSBs sicherlich von größerer Relevanz, als im Fall von isolierten DSBs, und könnte zur biologischen Wirksamkeit der ^{12}C -Ionenstrahlung beitragen.

Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungs-Experimente wurde neben den diskreten γH2AX Foci ein diffuses, pan-nukleäres γH2AX -Signal entdeckt, dessen mittlere Intensität im Vergleich zu den Foci etwa halb so groß war. Wie bei den Foci stieg die mittlere Intensität des pan-nukleären Signals linear mit der Strahlendosis und lag bei ^{12}C -Ionen höher als bei Photonen. Aufgrund der Korrelation mit der Dosis und der Abwesenheit des Phänomens in unbestrahlten Zellen, konnte es sich nicht um ein Artefakt durch unspezifische Antikörperbindung handeln. Ein weiterer Versuch mit supraauflösender Lokalisationsmikroskopie ergab außerdem keinen Hinweis darauf, dass die pan-nukleäre Fluoreszenz lediglich Streulicht aus den Foci darstellte. Das pan-nukleäre γH2AX war in fast allen Zellen vorhanden und un-

terschied sich von der deutlich helleren Färbung, die nach UV-Bestrahlung in der S-Phase beobachtet wird [219]. Stattdessen handelte es sich vermutlich um die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung, die 2013 von Meyer et al. [220] beschrieben wurde: Im Unterschied zu der Situation nach UV-Bestrahlung wird diese Form von pan-nukleärem γ H2AX von ionisierender Strahlung verursacht und kommt in allen Zellzyklusphasen vor. Die Phosphorylierung ist Chromatin-gebunden, kolokalisiert mit MDC1, jedoch nicht mit 53BP1, und löst keine weitergehende Schadensantwort aus. Übereinstimmend mit den vorliegenden Daten ist das pan-nukleäre γ H2AX-Signal dosisabhängig, aber weder mit Apoptose, noch mit DSBs außerhalb der Foci assoziiert [220].

Meyer und Kollegen konnten zeigen, dass die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung von ATM und DNA-PK vermittelt wird. Da DNA-PK nur während der Bindung an DSBs aktiv ist, wird vermutet, dass sich die Kinase zusammen mit kleinen DNA-Fragmenten durch komplexe DSBs im Nukleoplasma verteilt [220]. Damit übereinstimmend bewirkt die Transfektion mit kurzen dsDNA-Fragmenten eine Hyperaktivierung von DNA-PK, die ebenfalls zu pan-nukleärem γ H2AX führt [221]. Übertragen auf die vorliegenden Daten wäre die höhere pan-nukleäre γ H2AX-Intensität nach ^{12}C -Ionen-Strahlung demnach ein Indiz für stärker geclusterte DSBs gegenüber Photonenstrahlung. ATM ist allerdings nicht auf permanente Assoziation mit der DNA angewiesen, um aktiv zu bleiben und könnte die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung auch unabhängig von DNA-Fragmenten vermitteln [220].

5.2. DSB-Reparatur und Schadenskomplexität

Um einen Einblick in das Reparaturverhalten und die Spätfolgen der Bestrahlung zu erhalten, wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt. Der Rückgang des γ H2AX-Signals wurde durchflusszytometrisch gemessen, um die Reparaturgeschwindigkeit abzuschätzen. Als charakteristische Größe wurde die relative Abnahme der Fluoreszenz innerhalb der Halbwertszeit (zwischen Spitzenwert und halbmaximalem Wert) bestimmt. Diese Angabe unterschätzt die tatsächliche Reparaturgeschwindigkeit im Sinne der Versiegelung von DSB-Enden pro Zeiteinheit, da die Dephosphorylierung von H2AX nach der Reparatur verzögert eintritt. Der Vergleich zwischen den FACS- und HCS-Ergebnissen zeigt, dass sich die γ H2AX-Focianzahl pro Zelle schneller verringert als die Gesamtintensität. Daraus lässt sich schließen, dass die Dephosphorylierung nicht unmittelbar nach der Reparatur erfolgt, sondern erst nach Umlagerung der γ H2AX-Moleküle. Es gibt Hinweise, dass γ H2AX zunächst durch ein unphosphoryliertes H2AX Molekül ausgetauscht wird, und die Dephosphorylierung erst erfolgt, nachdem das freigesetzte γ H2AX-Molekül an eine anderen Stelle im Chromatin diffundiert, wo es von der Phosphatase PP4 erkannt wird [222]. Für den Vergleich der Reparaturkinetik nach Photonen- und ^{12}C -Ionen-Bestrahlung sollte die Unterschätzung der absoluten Reparaturgeschwindigkeit unerheblich sein [223].

Die Ergebnisse zeigten, dass Photonen-induzierte DSBs effizienter repariert werden als ^{12}C -Ionen-induzierte. Die Reparatur setzte bei ^{12}C -Ionen verzögert ein (längere γ H2AX-Anstiegsphase) und dauerte länger an. Die Reparaturgeschwindigkeit (relativ zur Höhe des Schadens) war bei ^{12}C -Ionen-Strahlung geringer und weniger stark von der Dosis und der Zellzyklusphase abhängig, als bei Photonenstrahlung. Für beide Strahlenarten ergaben sich bei 1 Gy höhere Reparaturgeschwindigkeiten als bei 4 Gy; bei Photonenstrahlung waren diese Unterschiede jedoch erheblich größer als bei ^{12}C -Ionen-Strahlung. Insbesondere in der S-

und G2-Phase zeigten sich für Photonenstrahlung Hinweise auf mehr als doppelt so große Reparaturgeschwindigkeiten bei 1 Gy im Vergleich zu 4 Gy; bei ^{12}C -Ionen-Strahlung lagen die Abweichungen unterhalb von 25%.

Die dosisspezifischen Unterschiede bei der Reparatureffizienz nach Bestrahlung mit Photonen deutet auf eine unterschiedliche Gewichtung bei der Wahl des DSB-Reparaturwegs hin. Hierfür spricht, dass die Reparaturgeschwindigkeit bei 4 Gy auch in der G1-Phase niedriger war, in der die Reparatur fast ausschließlich auf nicht-homologer End-zu-End-Verknüpfung beruht, da keine homologe Rekombination möglich ist. Die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung läuft schneller ab als die Reparatur durch homologe Rekombination und setzt in der Regel vorrangig ein [93]. Die vergleichsweise hohen Reparaturgeschwindigkeiten bei 1 Gy lassen eine stärkere Beteiligung der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung als bei 4 Gy vermuten. Die Ursache hierfür könnte eine zunehmende Erschöpfung der Reparaturkapazität durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung sein.

Bei ^{12}C -Ionen-Strahlung hatte die Dosis nur wenig Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit (außer in der M-Phase). Die im Vergleich zu 1 Gy Photonenstrahlung viel kleineren Reparaturgeschwindigkeiten in der S- und G2-Phase deuten auf eine stärkere Beteiligung der homologen Rekombination bei ^{12}C -Ionen hin (siehe [205,224]). Die Western Blot-Analysen des für die homologe Rekombination essenziellen Proteins pBRCA1 bestätigten dies. Die Wahl des DSB-Reparaturwegs in der späten S- und G2-Phase hängt wahrscheinlich sowohl von der Komplexität der Chromatinstruktur [225], als auch des Schadens [24] ab. Welcher Faktor der entscheidende ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Goodarzi und Kollegen publizierten 2010, dass heterochromatische DSBs außerhalb der G1-Phase generell durch homologe Rekombination repariert werden, unabhängig von der Schadenskomplexität [225]. Übertragen auf die hier vorliegenden Ergebnisse hieße dies, dass ^{12}C -Ionen-Strahlung einen höheren Anteil der Schäden im Heterochromatin hinterlassen müsste als Photonenstrahlung. Außerdem müsste angenommen werden, dass sich bei Photonenstrahlung das Verhältnis zwischen eu- und heterochromatischen DSBs abhängig von der Dosis ändert, da die Reparaturgeschwindigkeit bei 1 Gy deutlich höher war als bei 4 Gy. Da bei höherer Dosis lediglich die Photonendichte, nicht jedoch die Photonenenergie ansteigt, ändert sich aber nichts an den grundlegenden Wechselwirkungen. Deshalb erscheint ein solches Szenario im untersuchten Dosisbereich wenig plausibel.

Die Eigenschaften der γH2AX Foci sprechen vielmehr für einen Zusammenhang zwischen der Schadenskomplexität und der Wahl des Reparaturwegs. Trotz höherem Gesamtschaden bei ^{12}C -Ionen-Strahlung ($\text{RDW}_{\text{Spitze}}$ ca. 2 bei 1 Gy und 1,5 bei 4 Gy) traten weniger Foci als bei Photonenstrahlung auf, die jedoch größer waren und länger bestehen blieben. Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass ^{12}C -Ionen- im Gegensatz zu Photonenstrahlung komplexere DSBs erzeugt, deren Reparatur schwieriger ist und stärker von der homologen Rekombination abhängt. Einige andere Arbeiten kommen zu dem gleichen Schluss [226–230]. Unabhängig davon ist anzunehmen, dass nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung generell zuerst angewandt wird; misslingt die Reparatur in der S- oder G2-Phase, so kann stattdessen homologe Rekombination eingeleitet werden [95,229]. Dass komplexe DSBs zumindest teilweise durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung repariert werden können, zeigt sich an einer verminderten Reparaturkapazität bei Unterdrückung dieses Reparaturwegs [231]. Schwerionenstrahlung scheint jedoch speziell die klassische DNA-PK-abhängige Form der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung zu hemmen [232].

5.3. Irreparable DSBs und ihre Spätfolgen

Dass ^{12}C -Ionen-induzierte DSBs aufgrund ihrer Clusterung schwerer zu reparieren sind als Photonen-induzierte, zeigte sich nicht nur an der Reparaturgeschwindigkeit, sondern auch anhand des Restschadens, der persistierenden Zellzyklusblockaden und der Apoptoseinduktion. Bei 1 Gy überwog die Anzahl der nach 50 h verbleibenden γH2AX Foci bei ^{12}C -Ionen-Strahlung etwa um das Doppelte und bei 4 Gy um das 3-fache (übereinstimmend mit den FACS-Ergebnissen bei 4 Gy: $\text{RDW}_{50\text{h}} = 2,9$). Gleichzeitig führten ^{12}C -Ionen bei beiden Dosen zu 2,6x so viel abgeschlossener Apoptose (subG1-Messung) und 6,2–7,4x so vielen Zellen mit eingeleiteter Apoptose (Casp3^{*+}).

Bei Betrachtung der Zellzyklusverteilung zeigte sich vor allem bei 4 Gy, dass ^{12}C -Ionen-Strahlung stärkere und länger anhaltende Zellzyklusblockaden verursachte als Photonenstrahlung. Beide Strahlenarten lösten sowohl G1/S-, als auch G2/M-Blockaden aus, jedoch dominierte bei ^{12}C -Ionen der G2/M-Arrest, während bei Photonen tendenziell der G1/S-Arrest überwog. Dies deckte sich mit der Zellzyklus-spezifischen Verteilung der Casp3^{*+} Zellen und betonte die besondere Relevanz der homologen Rekombination für die Reparatur ^{12}C -Ionen-induzierter DSBs. Obwohl bei ^{12}C -Ionen-Strahlung mehr Casp3^{*+} Zellen aus der G2-Phase stammten als bei Photonenstrahlung, lag der Casp3^{*+} Index bei 4 Gy für Photonenstrahlung 1,6–2,2x höher. Demnach führen G2-Blockaden bei Photonenstrahlung effizienter zur Einleitung der Apoptose als bei ^{12}C -Ionen-Strahlung. Dies widerspricht nicht den übrigen Ergebnissen, da ^{12}C -Ionen aufgrund des viel stärkeren G2-Blocks in der Summe mehr apoptotische G2-Zellen erzeugte; dennoch überrascht dieses Resultat, zumal bei 1 Gy ^{12}C -Ionen den höheren Casp3^{*+} Index in der G2-Phase aufwiesen (nicht signifikant).

Dies beruhte allein auf dosis-spezifische Unterschieden im Casp3^{*+} Index bei Photonenstrahlung: die Werte stiegen von 1 Gy zu 4 Gy um mehr als das Doppelte, während sie bei ^{12}C -Ionen-Strahlung ungefähr gleich blieben (~ 2). Dies könnte bedeuten, dass die Dosis (nur) bei Photonenstrahlung einen Einfluss auf die Effizienz der Apoptoseinduktion in G2-Zellen hatte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass überlebende Zellen, die sich nach Überwindung einer Zellzyklusblockade weiter teilen, den Casp3^{*+} Index verfälscht haben. Prinzipiell konkurriert die Apoptoseinduktion mit anderen Spätfolgen der Bestrahlung, wie Seneszenz, Autophagozytose oder dem Zelltod durch mitotische Katastrophe. Dosis-abhängige Unterschiede in der Apoptose-Effizienz können deshalb ein Indiz für Verschiebungen dieser Verhältnisse sein.

Autophagozytose konnte nicht nachgewiesen werden, es ist aber möglich, dass Seneszenz zur Verminderung des klonogenen Überlebens beiträgt. U87 Zellen sind PTEN-defizient und es gibt Hinweise darauf, dass der Verlust von PTEN bei Gliomzellen verstärkt zu Seneszenz führt, wenn eine hohe Aktivität der Akt-Kinase und oxidativer Stress, zum Beispiel durch Strahlung, zusammenkommen [233].

5.4. Neue Erkenntnisse zur Feinstruktur von DSB-Reparaturfoci durch supraauflösende Mikroskopie

Zur genaueren Untersuchung des Schädigungsprofils von ^{12}C -Ionen-Strahlung und der DSB-Reparaturantwort in U87 Zellen wurden Bestrahlungsexperimente an der Ionenstrahlanlage SNAKE der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Zellen wurden in

einem flachen Winkel mit einzelnen/wenigen Hoch-LET Ionen ($\sim 450 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) beschossen und nach unterschiedlich langen Zeiträumen fixiert. Nach Immunfärbung von γH2AX und dem pBRCA1 wurden die Proben mit einem neuartigen Mikroskop untersucht, das zwei supraauflösende Mikroskopiertechniken in einem Gerät vereint. Dabei handelte es sich um Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) und eine Variante der Lokalisationsmikroskopie (SPDM), mit der es möglich ist einzelne Fluorophore zu lokalisieren. Mit Hilfe von SIM wurde die äußere Gestalt der γH2AX und pBRCA1 Foci in 3D vermessen, während die innere Struktur der γH2AX Foci hauptsächlich mit SPDM in 2D untersucht wurde.

5.4.1. Sekundärfoci tragen zur Wirkung von ^{12}C -Ionen bei

Die 3D-SIM Aufnahmen zeigten die Bildung sekundärer Foci zwischen 4–26 h nach Bestrahlung, nachdem die meisten primären γH2AX und pBRCA1 Foci im Zuge der DSB-Reparatur bereits verschwunden waren. Die primären und sekundären Foci unterschieden sich in mehreren Aspekten voneinander: nach 26 h waren die Sekundärfoci aufgrund ihrer kompakten Gestalt und der weniger zerfurchten Oberfläche sphärischer als die Primärfoci. Die Sekundärfoci lagen im gesamten Zellkern verteilt vor, anstatt einem Pfad in unmittelbarer Nähe des Ionendurchgangs zu folgen. Der Grad der Kolo-kalisation zwischen γH2AX - und pBRCA1 war in den Sekundärfoci höher als in den Primärfoci. Außerdem übertrafen die Sekundärfoci die Primärfoci auf dem Höhepunkt ihrer Ausprägung in ihrer Anzahl, dem Gesamtvolumen und der Gesamtoberfläche pro Zellkern fast um das Doppelte.

Die Sekundärfoci wiesen darauf hin, dass mindestens 4 h nach Bestrahlung neue DSB entstanden sein müssen, die nicht unmittelbar, sondern indirekt durch den Schwerionenbeschuss verursacht wurden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die sekundären DSBs im Zuge der DNA-Replikation während der S-Phase aus anderen Läsionen hervorgegangen sind. Replikationsbedingte einendige DSBs sind in der Literatur gut dokumentiert [25, 49, 234, 235]. Ihre Entstehung trägt beispielsweise zur Zytotoxizität des Replikationshemmstoffs Hydroxyurea [25] und von UV-Strahlung [49] bei. Außerdem sind replikationsbedingte DSBs auch radiobiologisch relevant, da sie die zellabtötenden Wirkung von γ -Strahlung verstärken [235, 236]. Im vorliegenden Fall könnte ein replikationsabhängiger Entstehungsmechanismus sekundärer DSBs von noch größerer Bedeutung sein, da Schwerionenstrahlung die Bildung komplexer geclusterter DNA-Schäden fördert [20, 24]. Der Effekt war bei den ^{12}C -Ionen-Bestrahlungen am SNAKE deutlicher ausgeprägt als bei den vorherigen Experimenten am HIT. Dies ist wahrscheinlich auf den deutlich höheren LET bei der Bestrahlungsanordnung am SNAKE zurückzuführen ($\sim 450 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ monoenergetisch, gegenüber $\sim 120 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ durchschnittlich im spread-out Bragg-Peak am HIT).

Vereinzelte Einzelstrang- oder Basenschäden können schnell repariert werden und sind als Ursache für die späte Entstehung sekundärer Foci eher unwahrscheinlich. Treten solche Schäden hingegen in Clustern auf, so kann dies ihre Reparatur deutlich verlangsamen oder gar unterbinden; vor allem bei gemischten Schäden können sich verschiedene Reparatursysteme gegenseitig behindern [226, 237]. Es wird abgeschätzt, dass DSBs nur etwa 1% aller DNA-Schäden ausmachen, die durch γ -Strahlung verursacht werden [238]; bei Schwerionenstrahlung ist dieser Anteil nicht bekannt, doch es ist davon auszugehen, dass auch dabei Nicht-DSB-Schäden am häufigsten vorkommen.

Eine große Anzahl primärer Cluster aus Nicht-DSB-Schäden könnte die vielen sekundären γH2AX - und pBRCA1-Foci erklären, jedoch bleibt die Frage, warum diese verteilt im Zellkern

auftauchen, anstatt nahe des Ionendurchgangs. Ein wichtiger Aspekt könnte sein, dass ausschließlich DSBs und lange Einzelstranglücken erwiesenermaßen Kontrollpunkt-abhängige Zellzyklusblockaden auslösen [14]. Deshalb ist es möglich, dass nach der Reparatur primärer DSBs eine Zellzyklusblockade wieder aufgehoben wird, obwohl noch geclusterte Nicht-DSB-Schäden in der DNA vorhanden sind. Solche Schäden würden im Zuge von Chromatin-Umlagerungen beim Übergang in die nächste Zellzyklusphase ebenfalls verlagert werden. Tatsächlich zeigte sich bis 30 min nach Bestrahlung ein Rückgang des durchschnittlichen Zellkern- und DNA-Volumens gegenüber den unbestrahlten Kontrollen, der sich als kurzfristige G1/S-Blockade interpretieren lässt, während signifikant erhöhte Werte auf einen G2-Arrest nach 26 h hinweisen. Beide Beobachtungen passen zu der Hypothese, dass die sekundären DSBs aus Nicht-DSB-Schäden hervorgehen, die über die G1/S-Grenze hinweg existieren. Der hohe Kollokalisationsgrad zwischen sekundären pBRCA1 und γ H2AX Foci legt den Ablauf eines Homologie-basierten DSB-Reparaturmechanismus nahe [239,240]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf replikationsbedingte Sekundärfoci, da deren Reparatur durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung nicht möglich ist, und stattdessen auf der Bruch-induzierten Replikation beruht [87]. Im Unterschied zur klassischen DSB-Reparatur durch homologen Rekombination ist die Bruch-induzierte Replikation sehr fehleranfällig und führt häufig zu Chromosomenaberrationen, wie Translokationen, Deletionen oder Inversionen [241,242]. Die Bedeutung von replikationsbedingten sekundären DSBs könnte daher, insbesondere für die Strahlentherapie mit Schwerionen, größer sein, als bisher angenommen.

Zusätzlich zu replikationsbedingten sekundären DSBs besteht die Möglichkeit, dass δ -Elektronen Sekundärschäden direkt außerhalb der Ionenflugbahn verursacht haben. Nakajima und Kollegen haben kürzlich von γ H2AX Foci berichtet, die abseits der Flugbahn schneller Eisenionen in bestrahlten Zellen zu finden waren [243]. Computersimulationen zur DSB-Induktion durch Delta-Elektronen stimmten gut mit den Beobachtungen überein. Die γ H2AX Foci konnten unmittelbar nach Bestrahlung beobachtet werden; im Gegensatz zu den hier diskutierten einendigen Sekundärschäden handelte es sich also um typische direkt induzierte DSBs mit zwei Bruchenden. Ungeachtet dessen ist es sehr wahrscheinlich, dass δ -Elektronen mit Energien, die zur DSB-Induktion ausreichen, auch mehrere andere Schäden auf ihrem Weg durch den Zellkern hinterlassen können. Werden diese nicht schnell genug repariert, so können sie ebenfalls zu den replikationsabhängigen Sekundärfoci führen, die hier beobachtet wurden. Es sei angemerkt, dass in der Arbeit von Nakajima und Kollegen trotz einem Beobachtungszeitraum von bis zu 48 h keine Sekundärfoci auftraten; allerdings war die Beobachtung replikationsbedingter Sekundärfoci aufgrund des experimentellen Ansatzes auch nicht möglich, da gezielt Zellzyklusblockaden ausgelöst wurden, um die Wirkung der Bestrahlung mit Eisen- und ^{12}C -Ionen in verschiedenen Zellzyklusphasen getrennt betrachten zu können.

Theoretisch könnte auch eine langsame Verlagerung der primären DSBs zu der Beobachtung von Foci abseits der Ionenflugbahn beitragen, sofern sie über viele Stunden hinweg nicht repariert werden können. Jakob und Kollegen konnten 2011 belegen, dass DSBs im Heterochromatin innerhalb weniger Minuten an die Grenze zum Euchromatin verlagert werden [201]. Andererseits zeigen andere Arbeiten der selben Gruppe, dass abgesehen, von diesen lokal begrenzten Verlagerungen, die Beweglichkeit von DSBs und assoziierten Reparaturfoci im Allgemeinen sehr gering ist [214]. Mit Hilfe von Lebendzellmikroskopie mit Live-

Bilderfassung maßen sie, dass sich 53BP1 Foci nach Schrägbestrahlung von U2OS Zellen mit Nickelionen innerhalb von 12 h durchschnittlich nur 2–3 μm von ihren Entstehungsort entfernen. Es ist allerdings denkbar, dass die Beweglichkeit nur bei DSBs so stark eingeschränkt ist, die durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung repariert werden, da hierbei die Bruchenden durch DNA-PK sehr eng zusammengehalten werden. In G2-Zellen, bei denen auch homologe Rekombination als Reparaturweg in Frage kommt, wird die schnelle Komponente der Reparaturkinetik (innerhalb von etwa 2 h nach DSB-Induktion) mit nicht-homologer End-zu-End-Verknüpfung in Verbindung gebracht, die langsame Komponente (Reparaturdauer >2 h) hingegen mit homologer Rekombination [94,95]. Folglich besteht die Möglichkeit, dass sich länger vorhandene DSBs nicht nur weiter von ihrem Entstehungsort entfernen können, weil sie länger dafür Zeit haben, sondern auch, weil ihr Reparaturmechanismus ihnen mehr Bewegungsfreiheit erlaubt. Dies könnte die immer größer werdenden Abweichungen der Foci-Positionen von geraden Ionenflugbahnen erklären, die sich zwischen 1 h und 4 h nach Bestrahlung zeigten.

Auch wenn anzunehmen ist, dass die beobachteten Sekundärfoci auf replikationsbedingte DSBs hinweisen, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sie durch andere Mechanismen hervorgerufen wurden, die nicht zwingend mit verbleibenden DNA-Schäden in Verbindung stehen müssen. Es ist bekannt, dass sich γH2AX Foci auch in Abwesenheit von DSBs bilden können, und dass die Menge der H2AX-Phosphorylierung im Zellzyklus-Verlauf schwankt [244]. Beispielsweise lässt sich nach UV-Bestrahlung pan-nukleäres γH2AX während der G1- und S-Phase beobachten, das nicht mit DSBs, sondern der Nukleotidexzisionsreparatur assoziiert ist [47,219]. Es ist noch nicht geklärt, welche Bedeutung die H2AX-Phosphorylierung unter physiologischen Bedingungen hat. Bemerkenswert ist aber, dass sie vor allem an besonders bruchanfälligen Stellen im Chromatin zu finden ist, weswegen vermutet wird, dass γH2AX auch in Abwesenheit von DSBs eine Rolle bei der Wahrung der genomischen Integrität spielt [245]. Es wäre durchaus möglich, dass ein solcher Mechanismus in einer Zelle aktiviert wird, die erfolgreich eine erhebliche Schädigung ihrer DNA überstanden hat, insbesondere wenn eine Hemmung der Apoptose vorliegt, wie im Fall der hier untersuchten Glioblastomzelllinie.

5.4.2. γH2AX -Foci bestehen aus vielen kleineren Subfoci

Schwerionenstrahlung induziert größere γH2AX als Photonenstrahlung [202]; Die Aufklärung der inneren Struktur von γH2AX Foci könnte dabei helfen, zu verstehen, warum das so ist, und möglicherweise zu einem tieferen Verständnis des unterschiedlichen Schädigungspotentials beider Strahlenqualitäten führen. Aufgrund des eingeschränkten Auflösungsvermögens lassen konventionelle Mikroskopietechniken, inklusive der Konfokalmikroskopie jedoch nur vage Mutmaßungen über den Aufbau der Foci zu. Mit Hilfe von Bildentfaltung konnten Nakajima und Kollegen kürzlich zeigen, dass durch Schwerionen induzierte γH2AX Foci mehrere Zentren erhöhter Intensität aufweisen [243]. Wir konnten diesen Befund durch supraauflösende Mikroskopie bestätigen. Die SPDM-Methode erlaubte es uns darüber hinaus, einzelne γH2AX Subfoci mit hoher Genauigkeit zu unterscheiden und zu vermessen.

Die Betrachtung der einzelnen Ebenen in den 3D-SIM-Aufnahmen zeigte, dass die γH2AX Foci nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen eine Feinstruktur aufweisen, die an gewundene Ketten aus annähernd runden Objekten erinnern. Durch Überlagerung der SIM-Aufnahmen mit noch höher aufgelösten SPDM-Bildern in der übereinstimmenden Bildebene, traten weitere

Strukturdetails zu Tage, die den Eindruck von eng aneinandergereihten Subfoci bestärkte. Zur quantitativen Auswertung wurden die Positionsinformationen der γ H2AX-Signale aus den SPDM-Aufnahmen herangezogen. Eine Dichte-basierte Clusteranalyse ergab, dass sich 1 h nach Bestrahlung durchschnittlich 93 Subfoci innerhalb der Foci-Regionen befanden, und weitere 113 im restlichen Zellkern. Das Aufkommen der sekundären Foci nach 26 h war ebenfalls von einer steigenden Subfoci-Anzahl innerhalb, jedoch nicht außerhalb der Foci, begleitet. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass sich die Größe und Signalanzahl der Subfoci während der Reparatur nur wenig änderte; beide Werte waren innerhalb der Foci größer als außerhalb. Tendenziell zeigte sich, dass die Subfoci während der Reparatur etwas kleiner wurden und zwischen 4 und 26 h wieder zunahmten. Dabei blieben die Subfoci außerhalb der Foci-Regionen annähernd kreisrund und die innen liegenden wurden zunehmend länglicher.

Der flächenäquivalente Kreisdurchmesser der Subfoci betrug durchschnittlich 113 nm innerhalb der Foci und 90 nm außerhalb. Die geringe Änderung dieser Werte während der Reparatur lassen vermuten, dass die Subfoci die grundlegenden Einheiten der großen γ H2AX Foci darstellen. Übereinstimmend haben Bewersdorf und Kollegen 2006 abgeschätzt, dass bereits das unphosphorylierte H2AX in Clustern mit ~ 100 nm Durchmesser vorliegt [246]. Die Autoren benutzten für ihre Messungen 4Pi-Mikroskopie, die ebenfalls zu den supraauflösenden Techniken zählt. Auch die Größe von γ H2AX Foci nach Bestrahlung mit Photonen wurde untersucht. Im Unterschied zu den hier verwendeten Methoden, verbessert ein 4Pi-Mikroskop die Auflösung jedoch entlang der optischen Achse und nicht lateral. Deshalb war es nicht möglich genauere Angaben zum inneren Aufbau der γ H2AX Foci zu erhalten.

Da das γ H2AX in den Nukleosomen vorkommt, zeichnet die Färbung Abschnitte der lokalen Chromatinstruktur nach. Einige der besonders längliche Subfoci in den Foci-Regionen wiesen eine Dicke von 40–60 nm auf. Berücksichtigt man die Lokalisationsgenauigkeit der Fluoreszenzsignale (ca. 15 nm), sowie die Größe der Antikörper für die γ H2AX-Markierung, so liegt dieser Wert in der Größenordnung einzelner Nukleosomen (ca. 11 nm). Auch die gewundene Form der Subfoci und die Lücken zwischen ihnen sprechen dafür, dass sie aus Nukleosomen bestehen, die entlang der Chromatinfaser eng benachbart sind. Ob diese Einheiten Reparaturcluster oder einzelne DSBs repräsentieren, lässt sich nicht ohne weitere Untersuchungen angeben. Prinzipiell könnte die Substruktur der Foci auch durch lokale Unterschiede im Chromatinstatus hervorgerufen werden, wodurch stellenweise die H2AX-Phosphorylierung eingeschränkt wird. Die wohl definierte Größe und Gestalt der Subfoci sprechen aber gegen diese Interpretation.

5.4.3. ^{12}C -Ionen verursachen H2AX- und BRCA1-Phosphorylierung auch abseits ihrer Flugbahn

Neben den großen Foci und den Subfoci, traten unmittelbar nach Schrägbestrahlung mit ^{12}C -Ionen auch kleine, aber helle γ H2AX- und pBRCA1-Signale abseits der Ionenflugbahn auf. Sie verteilten sich ohne erkennbare Ordnung im gesamten Zellkern und waren, im Gegensatz zu den spärlich in unbestrahlten U87 Zellen beobachteten Hintergrundsignalen, deutlich heller und zahlreicher. Weiterhin zeigten sie keine Kollokalisierung zwischen γ H2AX und pBRCA1. Die kleinen γ H2AX-Signale dominierten zu den frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung und verschwanden größtenteils mit dem Aufkommen der Sekundärfoci nach 26 h.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen berichten auch Nakajima und Kollegen

[243] von γ H2AX-Signalen, die abseits der Ionenflugbahn entstehen und im Gegensatz zu den Foci entlang der Ionenspur kleiner und weniger strukturiert sind (sie enthielten weniger Intensitätszentren). Die Autoren führen diese „Off-track-Signale“ auf DSBs zurück, die durch δ -Elektronen entstanden sind. In unserem Fall ist es unwahrscheinlich, dass sich alle abseits der Ionenflugbahn gelegenen γ H2AX-Signale auf diese Weise erklären lassen: In den Experimenten von Nakajima und Kollegen fanden sich nur 2–5 solcher Signale nach Bestrahlung mit Eisenionen, übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Computersimulationen der DSB-Induktion durch δ -Elektronen. Im vorliegenden Fall wurden deutlich mehr Signale abseits der Ionenspur gefunden, obwohl die Reichweite der δ -Elektronen aufgrund des höheren LETs der ^{12}C -Ionen ($450 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$) gegenüber den Eisenionen ($200 \text{ keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$) deutlich geringer war ($<1 \mu\text{m}$ statt 2 mm nach einem Modell der Ionisationsstruktur von Kiefer et al. [247]). Es erscheint daher fraglich, ob diese Signale DSBs repräsentieren.

Stattdessen könnte es sich um die Feinstruktur des pan-nukleären γ H2AX-Signals handeln, das bereits in Abschnitt 4.1.2 diskutiert wurde. Übereinstimmend mit der dort bereits erwähnten Arbeit zu diesem Phänomen von Meyer et al. [220], zeigten die pan-nukleären Signale eine ähnliche Kinetik und traten nur vorübergehend auf. Die Beobachtung von diskreten Signalen anstelle einer mehr oder weniger homogenen Fluoreszenz ist wahrscheinlich auf die überlegene optische Auflösung des hier verwendeten Mikroskops zurückzuführen.

5.5. Potenzielle Schlussfolgerungen für die klinische Strahlentherapie mit Schwerionen

Aus den hier erhaltenen Daten lassen sich möglicherweise neue Ansatzpunkte für die klinische Anwendung der Schwerionenstrahlung und ihrer Kombination mit chemo- oder immuntherapeutischen Strategien zur Krebsbehandlung ableiten. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass die replikationsbedingte Entstehung von sekundären DSBs stärker zur Strahlenwirkung von ^{12}C -Ionen beiträgt als bisher angenommen. Diese einendigen DSBs erfordern eine Reparatur durch homologe Rekombination. Auch für die Beseitigung geclusterter DSBs, die primär durch ^{12}C -Ionen-Strahlung verursacht wurden, war die homologe Rekombination von großer Bedeutung. Insbesondere zeigte sich im Vergleich mit Photonenstrahlung eine stärkere und länger anhaltende Aktivierung von BRCA1, einer Kernkomponente der homologen Rekombination. Die Schwerionentherapie sollte sich daher gut zur Behandlung von Tumoren mit BRCA1-Defizienz und anderen Defekten in der homologen Rekombination eignen. Theoretisch könnten deshalb besonders Patienten mit genetisch bedingten Mamma- oder Ovarialkarzinomen von der Schwerionentherapie profitieren [248].

Um die Relevanz der Ergebnisse für die ^{12}C -Ionen-Therapie von Glioblastom-Patienten zu beurteilen, muss der genetische Hintergrund der untersuchten U87 Zellen berücksichtigt werden. Das Genom der Zelllinie wurde 2010 vollständig sequenziert und weist zahlreiche Mutationen, Insertionen, Deletionen und Translokationen auf [174]. Unter den DSB-Reparaturgenen ist hiervon nur MRE11B direkt betroffen (es enthält eine Mutation in einer Intron-Spleißsequenz). Die Isoform MRE11A, die für die funktionelle Nuklease Mre11 des MRN-Komplexes codiert, ist nicht verändert. Im U87 Genom sind allerdings Gene mit Knockout-Mutationen enthalten, die sich nachweislich indirekt auf die DSB-Reparatur auswirken können, insbesondere PTEN und XPC, die beide homozygot defekt sind. XPC spielt als Kernkomponente der GG-NER vor allem eine Rolle bei der Beseitigung von Pyrimidin-

Dimeren und anderen typischen UV-Schäden in transkriptionell inaktiver DNA. Für die DSB-Reparatur ist XPC nicht erforderlich, jedoch führt XPC-silencing in HeLa Zellen zu einer Reduktion der DSB-Reparaturaktivität durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung auf bisher ungeklärte Weise [249].

PTEN-Defizienz in Gliomzellen hat interessanterweise den gegenteiligen Effekt: PTEN ist eine Lipid-Phosphatase, die verschiedene Phosphatidylinositole dephosphoryliert und damit den PI3K/Akt-Signalweg hemmt. Dieser spielt bei der Karzinogenese von Gliomen und einigen weiteren Tumoren eine wichtige Rolle, da Akt das Zellüberleben nach Bestrahlung fördert und zur Entwicklung von Strahlenresistenzen beiträgt. Akt ist eine Kinase, die direkt mit DNA-PKcs interagiert und auf diese Weise die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung verstärkt [250]. Fehlt PTEN, so führt dies zur Hyperaktivierung von Akt und folglich der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung. Gleichzeitig hemmt Akt die homologe Rekombination und die ATR-vermittelte DNA-Schadensantwort, indem es TopBP1 und Chk1 phosphoryliert und auf indirekte Weise die Rekrutierung einiger erforderlicher Proteine an den Schadensort hemmt (darunter RPA, BRCA1 und Rad51) [251]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass der Verlust von PTEN in Gliomzellen direkt die homologe Rekombination hemmt, da PTEN die Expression von Rad51 verstärkt [252].

In diesem Zusammenhang erscheint die Kombination von ^{12}C -Ionen-Strahlung und Temozolomid besonders in PTEN-defizienten Glioblastomen sinnvoll. Temozolomid ist ein DNA-alkylierendes Agens, das zu sekundären DSBs während der Replikation führt und standardmäßig zur Chemotherapie von Glioblastom-Patienten nach konventioneller Bestrahlung mit Photonen eingesetzt wird. Die sekundären DSBs könnten die durch ^{12}C -Ionen-Strahlung bedingte Abhängigkeit der Zellen von der homologen Rekombination [228] weiter verstärken. Übereinstimmend hat eine retrospektive Studie am Heidelberger Ionentherapiezentrum ergeben, dass eine Kombinationstherapie mit ^{12}C -Ionen-Strahlung und Temozolomid Vorteile bei der Behandlung von Patienten mit hochgradigen Gliomen bieten könnte [253]. Derzeit wird eine solche Kombinationstherapie in einer klinischen Studie getestet [254].

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Takahashi et al. wurde mit Hilfe von Ligase-4-, bzw. Rad54-Knockout-Mutanten untersucht, ob die DSB-Reparatur durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung oder homologe Rekombination entscheidend für die Sensitivität von embryonalen Fibroblasten gegenüber Hoch-LET-Strahlung ist [255]. Die Studie zeigt, dass ^{12}C - und andere Schwerionen im Gegensatz zu Photonenstrahlung die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung beeinträchtigt. Obwohl sich dieses Ergebnis damit deckt, dass die homologe Rekombination bei ^{12}C -Ionen-Strahlung folglich eine größere Rolle spielt als bei Photonenstrahlung, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Hemmung der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung eine vielversprechendere Strategie zur begleitenden Schwerionentherapie darstellt: Die Ligase-4-defizienten Zellen zeigten gegenüber den Wildtypzellen eine größere Steigerung der Strahlenwirkung (sensitization enhancement ratio) als die Rad54-defizienten Zellen. Bemerkenswerterweise traf dies sowohl bei Schwerionen-, als auch Photonenstrahlung zu.

Da die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung insbesondere in der G1-Phase den dominierenden DSB-Reparaturmechanismus darstellt, könnte ihre chemotherapeutische Hemmung den Vorteil bieten, dass auch ruhende oder langsam proliferierende Tumorstammzellen betroffen sind, die oftmals eine hohe Strahlenresistenz aufweisen [255]. Es kann jedoch nicht sicher beantwortet werden, ob eine solche Strategie aufgrund der zu erwartenden Ne-

benwirkungen tatsächlich einen therapeutischen Nutzen hätte: Ein Großteil aller Körperzellen ist ebenfalls auf die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung angewiesen und aufgrund der Bedeutung der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung für die V(D)J-Rekombination wäre von einer Immunsupprimierung auszugehen.

Ob in den hier untersuchten Glioblastomzellen trotz der großen Bedeutung der homologen Rekombination bei ^{12}C -Ionen-Strahlung auch die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung die Strahlensensitivität maßgeblich beeinflusst, ist nicht bekannt; es gibt zwar Hinweise darauf, dass die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung auch außerhalb der G1-Phase den ersten Reparaturansatz darstellt, jedoch bedeutet das nicht unbedingt, dass die Reparatur auch hierdurch abgeschlossen wird [93]. So zeigen Untersuchungen zur Aktivität der Nuklease CtIP und des Einzelstrang-Bindeproteins RPA, dass speziell nach Hoch-LET Bestrahlung mit Schwerionen bei $\sim 85\%$ aller mit γH2AX markierten DSB-Foci eine ausgedehnte Resektion der Bruchenden stattfindet [228]. Dies verhindert den Abschluss der Reparatur durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung und fördert die homologe Rekombination [95]. Bemerkenswerterweise konnte auch in der G1-Phase in bis zu 40% der DSB-Foci End-Resektion nachgewiesen werden [228]. Da während der G1-Phase keine Schwesterchromatiden für die homologe Rekombination zur Verfügung stehen, greifen die Zellen in solchen Situationen offenbar auf alternative DSB-Reparaturmechanismen zurück [228].

Entsprechende „Backup“-Mechanismen zur nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (B-NHEJ) beruhen zumindest teilweise auf Mikrohomologien zwischen den Bruchenden [85]. Sie erfordern einen gewissen Grad der End-Resektion, sowie vermutlich einige Enzyme, die auch für die homologe Rekombination relevant sind, darunter PARP und Ligase III [84]. Zellzykluspezifische Untersuchungen haben ergeben, dass nach Photonenstrahlung die meisten DSBs durch B-NHEJ repariert werden, wenn Defekte in der DNA-PK-abhängigen nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (D-NHEJ) vorliegen [84,256]. Auch in der G2-Phase wurde B-NHEJ bevorzugt vor der homologen Rekombination benutzt. Wang und Kollegen konnten zeigen, dass Hoch-LET-Strahlung (in diesem Fall Eisenionen) speziell die D-NHEJ hemmt, nicht jedoch die B-NHEJ oder die homologe Rekombination [232]. Kleine DNA-Fragmente (<40 bp), die durch geclusterte DSBs entstehen, könnten dafür verantwortlich sein, weil sie speziell die Bindeeffizienz der für D-NHEJ unerlässlichen Ku-Proteine stark beeinflussen [257]. Vor diesem Hintergrund erscheint der Einsatz von PARP-Inhibitoren in Kombination mit ^{12}C -Ionen-Strahlung sinnvoll. Neben der Hemmung von B-NHEJ fördert PARP-Inhibition die Entstehung von sekundären DSBs, weil PARP auch für die Erkennung von Einzelstrangbrüchen wichtig ist, die zu Replikationsblockaden führen können [27,252]. Auf diese Weise könnte eventuell das Konzept der synthetischen Letalität mit den Vorteilen der Schwerionentherapie in Bezug auf biologische Wirksamkeit und Tumorkonformität kombiniert werden.

Inwieweit sich diese Analysen und Überlegungen aus der Zellkultur klinisch auswirken, muss letztendlich im Rahmen von klinischen Studien mit Patienten überprüft werden.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit Grundlagen für die unterschiedliche Wirksamkeit von ^{12}C -Ionen- und Photonenstrahlung aufgedeckt und optisch sichtbar gemacht, sowie neue Erkenntnisse zur Entstehung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung gefunden. Diese Themen sind nicht nur für die radiobiologische Grundlagenforschung, sondern auch im Rahmen der klinischen Strahlentherapie und

des Strahlenschutzes von Bedeutung. Durch Verwendung von superauflösender Mikroskopie und Weiterentwicklung relevanter Auswertungssoftware wurde ein Beitrag dazu geleistet, dass diese noch relativ junge Disziplin der Optik Einzug in die radiobiologische Forschung hält. Die Ergebnisse zur Feinstruktur der DSB-Reparaturfoci lassen nur grob erahnen, welches große Potenzial die superauflösende Fluoreszenzmikroskopie auch für andere Forschungsgebiete noch bereit hält; So bedeutete es allgemein für die Anwendung dieser Methoden in der Biologie eine große Ermutigung, dass jüngst im Jahr 2014 Eric Betzig, Stefan W. Hell und William E. Moerner für ihre Beiträge zur Entwicklung der superauflösenden Fluoreszenzmikroskopie mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden.

A.1. MATLAB Algorithmen

Dieser Abschnitt enthält die Dokumentation zu den MATLAB-Funktionen, die in dieser Arbeit implementiert wurden, um Daten auszuwerten, die mit supraauflösender Mikroskopie gewonnen wurden. Die Funktionen und alle erforderlichen Zusatzdateien wurden auf einer Online-Plattform zum Austausch von Quellcodes für supraauflösende Mikroskopie veröffentlicht. Sie ist unter <https://code.iri.uni-frankfurt.de/trac/microscopy/> zu erreichen.

Sämtliche Informationen sind im Code der einzelnen Funktionen kommentiert, und können auch über die Hilfsfunktion von MATLAB abgerufen werden. Hier sind **Variablen** blau hervorgehoben und `<1xN Typ>` bezeichnet die Dimensionalität und den Datentyp einer Variablen; in Anlehnung an MATLAB werden mehrere Dimensionen durch `x` getrennt und Zahlen geben die Anzahl der Elemente in jeder Dimension an. Großbuchstaben stehen für eine beliebige, bzw. nicht festgelegte Anzahl an Elementen. In einigen Fällen sind unterschiedlich viele Dimensionen möglich, die dann in runden Klammern stehen.

Bei numerischen Datentypen steht `numerical` für einen beliebigen Zahlentyp und `uint` für einen vorzeichenlosen Ganzzahlentyp. Alle explizit angegebenen numerischen Datentypen beziehen sich auf den typischerweise erwarteten Wertebereich; mächtigere Datentypen können ebenfalls verwendet werden, jedoch sind dann Werte außerhalb des erwarteten Bereichs zu vermeiden, da es sonst i.d.R. zu Informationsverlust kommt. Insbesondere sollte die Unterscheidung zwischen Fließkomma-Zahlentypen, vorzeichenlosen und vorzeichenbehafteten Ganzzahlentypen beachtet werden.

A.1.1. Allgemeine Funktionen

GetSpecFiles

Syntax:

```
[files] = GetSpecFiles(inPath, searchStr)
```

Description:

Lists the files in the folder `inPath` that match to the name pattern(s) defined in `searchStr`.

Input:

```
inPath <1xN char> complete path of input folder incl. final '\'  
searchStr <1xN cell> containing N filename patterns as <1xN char>. The wildcard  
character '*' is allowed.  
Example: searchStr = {'568*', '488*', '404*'} could be used to list images  
named after the laser lines used for acquisition.
```

Output:

```
files <1xN cell> containing N lists with the matching filenames as <MxN char>. No  
list is added, if no match is found for a particular pattern; the empty  
cell is returned if no matches are found.
```

WriteOVkdf2tif**Syntax:**

```
[ ] = WriteOVkdf2tif(inPath, fnPattern, outPath)
```

Description:

Reads all KDF images matching the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath` and saves them as 8 bit TIFF files into the folder `outPath`. Intended to convert overview images e.g. showing the roi of an SPDM acquisition into a TIFF file that can be viewed with any ordinary image viewer.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```
inPath    <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern without extension; input files are named
            '*fnPattern.kdf', output files '*fnPattern.tif'
outPath   <1xN char> path of output folder
```

Grundlegende Ein- und Ausgabefunktionen**ReadImgRGB2GS****Syntax:**

```
[res] = ReadImgRGB2GS(filename)
```

Description:

Reads 2D or 3D KDF grayscale images, or 2D images of any filetype supported by MATLAB's 'imread' function (TIFF, BMP, JPG, GIF, PNG, ...). In the latter case 'RGB' images are converted to grayscale. Other color models like CMYK should not be used, as they might not be converted to grayscale correctly (mean of all samples/pixel is used for grayscale conversion).

Input:

```
filename <1xN char> complete path and filename, incl. extension
```

Output:

```
res      <YxXxZ numerical> 3D grayscale image
```

ReadImgs2Stack**Syntax:**

```
[res] = ReadImgs2Stack(inPath, fnPattern)
```

Description:

Creates an image stack from grayscale or color images matching the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath` and returns the stack. Supports various image formats (see 'imread' documentation).

Input:

```
inPath    <1xN char> input folder, incl. final file separator
fnPattern <1xN char> filename pattern
```

Output:

```
res      <XxY(xC)xZ numerical> image stack
```

ReadImgStack**Syntax:**

```
[res] = ReadImgStack(filename)
```

Description:

Reads grayscale or color 3D images of various formats (see 'imread' documentation).

Input:

`filename` <1xN char> complete path and filename of image file

Output:

`res` <YxX(xC)xZ numerical> image stack

ReadKDF

Syntax:

```
[res] = ReadKDF(filename)
```

Description:

Reads 2D or 3D grayscale KDF images (based on 'ReadKhorosData').

Input:

`filename` <1xN char> complete path and filename of input file, incl. '.kdf'

Output:

`res` <YxX(xZ) numerical> 2D or 3D grayscale image

WriteAlphaNumTiffs

Syntax:

```
[] = WriteAlphaNumTiffs(imgStack, outputPath, fileID)
```

Description:

Saves the 3D grayscale image stack `imgStack` as a sequence of 2D TIFF files in the folder `outPath`. The files are named 'fileID000.tif', 'fileID001.tif', 'fileID002.tif', ... (based on a template from Gerrit Best).

Input:

`imgStack` <YxXxZ numerical> 3D grayscale image

`outPath` <1xN char> path of output folder

`fileID` <1xN char> output file identifier (beginning of the filenames)

WriteKDF

Syntax:

```
[success] = WriteKDF(image, outputPath, filename)
```

Description:

Writes KDF images into the specified file in the folder `outPath` (based on 'WriteKhorosData'). Eventually occurring errors are caught and logged in the global variable `errLog`.

Input:

`image` <YxX(xZ) numerical> containing the image data (can be a 2D or 3D grayscale image)

`outPath` <1xN char> path of output folder

`filename` <1xN char> name of output file, incl. '.kdf'

Output:

`success` Returns 1 if successful OR 0 otherwise

WriteTiffImage

Syntax:

```
[success] = WriteTiffImage(image, outputPath, filename, method)
```

Description:

Writes `image` into the TIFF file `filename` in the folder `outPath`, using the given `method`.

Input:

```

image      <YxX(xCxZ) numerical> OR <XxY(xZ) dip_image> containing the image data (can
           be a 2D or 3D grayscale or color image)
outPath    <1xN char> path of output folder
filename   <1xN char> name of image file, incl. '.tif'
method     if == 1: uses 'imwrite' to actually write the file
           -> supports 2D grayscale and 2D or 3D color images
           -> no <dip_image> support
           -> Lossless 'LZW' compression
           if == 2: uses 'writeim' to actually write the file
           -> supports 2D- and 3D-grayscale images
           -> supports <dip_image>
           -> no compression

```

Output:

```

success    Returns 1 if successful OR 0 otherwise

```

Batchfunktionen**BatchFilesInFolder****Syntax:**

```

[] = BatchFilesInFolder(inPath, fnPattern, outPath, funHndl, varargin)

```

Description:

Batch function for 'SaveSPDMres' and functions with similar interfaces (functions that process single files instead of whole folders). Reads all files matching the filename pattern `fnPattern` and passes them to the function with the given handle `funHndl`. Result files are written to the folder `outPath`. Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```

inPath     <1xN char> path of input folder
fnPattern  <1xN char> filename pattern
outPath    <1xN char> path of output folder
funHndl    <function_handle> of the function to process in batch mode
varargin   <1xN cell> containing extra parameters for the respective function besides
           inPath, fnPattern and outPath

```

BatchFolders**Syntax:**

```

[] = BatchFolders(inPath, fnPattern, outPath, resFN, funHndl, keepFolderTree, varargin)

```

Description:

General batch function for multi-folder-processing. Calls the function with the handle `funHndl` for all folders and subfolders of the folder `inPath`. Results are written into the folder `outPath`, either directly (if `keepFolderTree` == 0), or using subfolders corresponding to the input folder tree (if `keepFolderTree` == 1). Useful for batch processing of 'PrepareSIMrecon', 'OrteDriftCorrection', 'SPDMdriftCorrection', 'BatchCorrectSIMbleach', ..., and not to forget 'BatchFilesInFolder', another batch function for multi-file processing in a single folder.

Input:

```

inPath     <1xN char> path of input folder
fnPattern  <1xN char> filename pattern
outPath    <1xN char> path of output folder
resFN      <1xN char> filename of batch result file OR 0 if no such file should
           be written
funHndl    <function_handle> of the function to process in batch mode
keepFolderTree <1x1 logical> either false (0) if results should be written directly
           to outPath, OR true (1), if subfolders corresponding to the input
           folder tree should be used (within outPath).

```

```
varargin    <1xN cell> containing extra parameters for the respective function
            besides inPath, fnPattern and outPath
```

BatchFoldersToFiles

Syntax:

```
[] = BatchFoldersToFiles(inPath, fnPattern, outPath, resFN, funHndl, varargin)
```

Description:

Batch function for 'CreateResultFiles' and functions with similar interfaces. Reads files from different folders and writes the results into the folder `outPath`, using the source folder name as the fileID (beginning) of the target file name.

Input:

```
inPath    <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern
outPath   <1xN char> path of output folder
resFN     <1xN char> filename of batch result file OR 0 if no such file should be
            written
funHndl   <function_handle> of the function to process in batch mode
varargin <1xN cell> containing extra parameters for the respective function besides
            inPath, fnPattern and outPath
```

BatchMeasure

Syntax:

```
[] = BatchMeasure(inPath, fnPattern, outPath, funHndl, varargin)
```

Description:

Batch function for 'CollectIntInfo', 'CollectIntInfoSIMacq', 'PixelsAboveTH' and functions with a similar interface. Such functions perform measurements on all images within a folder matching the filename pattern `fnPattern` and return the results as a `<MxN cell>` that can be saved to a result file using the 'SaveMeasurements' function. Also these functions set the `<1xN char>` global variable `measurementLabels` to contain a comma-separated list of labels for each measurement it performs. 'BatchMeasure' reads a folder and all of its subfolders and writes the results into a corresponding folder tree within `outPath`.

Input:

```
inPath    <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern
outPath   <1xN char> path of output folder
funHndl   <function_handle> of the measurement function to process in batch mode
varargin <1xN cell> containing extra parameters for the respective function besides
            inPath, fnPattern and outPath
```

Bildkorrektur

CorrectShift

Syntax:

```
[optRef, optRes, s] = CorrectShift(refImg, shiftedImg, useCuda, varargin)
```

Description:

Corrects the shift `s` between the two grayscale images `refImg` and `shiftedImg` that show corresponding structure features. If the input images have different sizes in x or y direction, `shiftedImg` will be scaled to fit the x/y size of `refImg` and eventual juts are clipped in both images (using 'MatchImgSizes'); in this case the pixel sizes need to be provided in `varargin` (see Input).

Works for 2D images, image stacks and combinations as follows:

- if both images are 2D or both images are 3D: `shiftedImg` is shifted back to match `refImg` with subpixel accuracy and parts sticking out are clipped in both images. 3D images must agree in the number of z-planes and voxel depth (uses

'CorrectShiftEqualDims'). Returns the shift corrected images and the shift vector `s` relative to `refImg`, in the order `x;y;z`)

- if one image is 2D and the other 3D: the best matching z-plane in the 3D image is determined with subvoxel accuracy, using a minimization algorithm and linear z-plane interpolation; 2D shift correction and jut clipping is included in this process (uses 'CorrectShiftMatchZ'). Returns the resulting 2D plane from the 3D image, the clipped 2D input image and the shift vector `s`, where `s(1)` is the shift in x, `s(2)` the shift in y (both relative to `refImg`) and `s(3)` is the position of the interpolated z-plane in the 3D image (1-based indexing)

Prepared for CudaMat usage (fast execution on the GPU of a graphics card that supports CUDA; toolbox by Rainer Heintzmann). See <http://www.nanoimaging.uni-jena.de/CudaMat> for further information.

Input:

`refImg` <YxX(xZ) numerical> reference image
`shiftedImg` <YxX(xZ) numerical> shifted image
`useCuda` <1x1 logical> use CudaMat (true) or don't (false)
`varargin` <1x2 cell> (optional) containing the pixel sizes of both images in a <1x1 numerical> as follows: `varargin = {pxSizeRefImg, pxSizeShiftedImg}`
`pxSizeRefImg` pixel size of `refImg` in nm
`pxSizeShiftedImg` pixel size of `shiftedImg` in nm
 If used, both pixel sizes need to be provided

Output:

`optRef` <YxX(xZ) numerical> `refImg` cropped to fit the final size of `optRes`
`optRes` <YxX(xZ) numerical> `shiftedImg` after shift correction relative to `refImg` and clipping of juts
`s` 2x1 double 2D or 3x1 double 3D shift vector

CorrectShiftEqualDims**Syntax:**

```
[resRefImg, resShiftedImg, s] = CorrectShiftEqualDims(refImg, shiftedImg)
```

Description:

Determines the shift between two images `refImg` and `shiftedImg` with the same dimensionalities (either 1D, 2D, or 3D of equal size) and corrects it by shifting back `shiftedImg`. Resulting juts are cropped and intensities are scaled to 8 bit in both images (negative values are clipped).

Returns the result images `resRefImg` and `resShiftedImg` and the shift vector `s`.

Prepared for CudaMat usage (fast execution on the GPU of a graphics card that supports CUDA; toolbox by Rainer Heintzmann). See <http://www.nanoimaging.uni-jena.de/CudaMat> for further information.

Input:

`refImg` <YxX(xZ) numerical> OR <YxX(xZ) cuda> reference image
`shiftedImg` <YxX(xZ) numerical> OR <YxX(xZ) cuda> image to correct

Output:

`resRefImg` <YxX(xZ) numerical> `refImg` cropped to fit the final size of `resShiftedImg`
`resShiftedImg` <YxX(xZ) numerical> `shiftedImg` after shift correction and clipping of juts (relative to `refImg`)
`s` <Nx1 double> 1,2 or 3-dimensional shift vector found between `refImg` and `shiftedImg` (relative to `refImg`) before correction

CorrectShiftMatchZ**Syntax:**

```
[optRef, optRes, optZPos, shift2D] = CorrectShiftMatchZ(refImg, zStack)
```

Description:

Interpolates image planes from the 3D image stack `zStack` to find the best match for the 2D reference image `refImg`. Shifts in the xy-plane are taken into account and corrected in the interpolated image.

Returns the interpolated and 2D shift corrected image plane `optRes`, its z-position within the stack `optZPos` and the 2D shift vector `optShift2D`. Also returns the reference

image cropped to fit the final size of `optRes`.

Uses `CudaMat`, if available (fast execution on the GPU of a graphics card that supports CUDA; toolbox by Rainer Heintzmann). See <http://www.nanoimaging.uni-jena.de/CudaMat> for further information.

Input :

`refImg` <YxX numerical> OR <YxX cuda> 2D reference image
`zStack` <YxXz numerical> OR <YxXz cuda> 3D image stack

Output :

`optRef` <YxX numerical> `refImg` cropped to fit the final size of its corresponding image plane in `zStack`
`optRes` <YxX numerical> image plane interpolated from `zStack` that matches `refImg` with subpixel accuracy. Shifts in 2D are corrected and juts are cropped
`optZPos` <1x1 double> z-position of `optRes` within `zStack` with subpixel accuracy (1-based indexing)
`shift2D` <2x1 double> 2D shift vector (x,y) found between `refImg` and its corresponding z-plane in `zStack` (relative to `refImg`) before correction

GetDriftVec

Syntax:

```
[res, preCorr, postCorr] = GetDriftVec(t0img, t1img)
```

Description:

Determines a drift vector based on two 2D-images acquired at different timepoints. Supports KDF (Khoros Data Format) and various other image formats (TIFF, BMP, JPG, GIF, PNG, ...); see documentation of MATLAB's 'imread' function for further details. RGB images are supported, but will be converted to grayscale for shift determination. Other color models like CMYK should not be used, as they might not be converted to grayscale correctly (mean of all samples/pixel is used for grayscale conversion). Mixing formats is possible but not recommended, as differences in bitdepth can lead to inaccuracies.

Input :

`t0img` <1xN char> complete path and filename of first image (t0)
`t1img` <1xN char> complete path and filename of second image (t1)

Output :

`res` <1x1 struct>: `res.xDrift` <1x1 double> linear drift velocity in x-direction in pixel/second
`res.yDrift` <1x1 double> linear drift velocity in y-direction in pixel/second
`preCorr` <YxXx3 uint8> RGB overlay with R=first image and G=second image before drift correction
`postCorr` <YxXx3 uint8> RGB overlay with R=first image and G=second image after drift correction

MatchImgSizes

Syntax:

```
[res0, res1] = MatchImgSizes(img0, img1, pxSize0, pxSize1, jutHandling)
```

Description:

Returns two images of the same size, based on the two 2D or 3D images `img0` and `img1`. `img1` is scaled to fit the pixel size of `img0` and juts are either filled with zeros in the smaller image or cropped (only in x- and y-direction) in the larger image, depending on the method chosen in `jutHandling`.

Input :

`img0` <YxX(xZ) numerical> (reference) image
`img1` <YxX(xZ) numerical> second image
`pxSize0` <1x1 numerical> (reference) pixel size of `img0` in nm
`pxSize1` <1x1 numerical> pixel size of `img1` in nm
`jutHandling` either of the following strings defining how to handle image parts that stick out after resizing `img1`:
'pad' juts are filled with zeros in the smaller image, centering the image between the padding (with pixel accuracy)


```

'padL' juts are filled with zeros at the lower bounds (left/top side) of
the smaller image
'padU' juts are filled with zeros at the upper bounds (right/bottom
side) of the smaller image
'crop' juts are cropped in the larger image, removing preferentially
equal parts from both bounds of each direction (with pixel
accuracy)
'cropL' juts are cropped at the lower bounds (left/top side) of the
larger image
'cropU' juts are cropped at the upper bounds (right/bottom side) of the
larger image

```

Output :

```

res0 <YxX(xZ) numerical> result image of img0
res1 <YxX(xZ) numerical> result image of img1

```

Bildanalyse**CollectIntInfo****Syntax:**

```
[res] = CollectIntInfo(inPath, fnPattern, outputPath, meanBG)
```

Description:

Collects intensity information from images that match the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath`. Returns the gathered information as a cell array and optionally writes it to comma-separated text files named `'IntInfo_fnPattern.txt'`.

Batch processing: Use `'BatchMeasure'` to process multiple folders.

Input:

```

inPath <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern, incl. extension; input files are named
'*fnPattern'
outPath <1xN char> path of output folder OR 0 if no result file should be written
meanBG <1x1 numerical> mean background value (estimation of camera noise) sub-
tracted from each pixel before the measurement OR an empty array. In the
latter case the images must be 3D and the mean background is calculated by
averaging all pixels of the 1st image plane, which is excluded from the
measurement. (The 1st plane is not excluded if a numerical value is pro-
vided).

```

Output:

```

res <8xN cell> containing the following information for N image files:
info{1} <1x1 cell> containing sample identifiers as <1xN char>
info{2} <1x1 double> minimal intensity (darkest pixel)
info{3} <1x1 double> mean intensity
info{4} <1x1 double> maximal intensity (brightest pixel)
info{5} <1x1 double> sum of all intensities
info{6} <1x1 double> mean background intensity (either set by the user or
calculated from a camera noise image)
info{7} <1x1 double> number of pixels
info{8} <1x1 double> background corrected intensity sum

```

PixelsAboveTH**Syntax:**

```
[res] = PixelsAboveTH(inPath, fnPattern, outputPath, TH)
```

Description:

Determines the number of pixels with an intensity $>$ the threshold value `TH` in all images that match the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath`. Returns the results as a cell array and optionally writes them to the comma-separated text file `'PixelsAbove_TH.txt'`.

Batch processing: Use `'BatchMeasure'` to process multiple folders.

Input:

```

inPath <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern, incl. extension; input files are named
            '*fnPattern'
outPath <1xN char> path of output folder OR 0 if no result file should be written
TH <1x1 numerical> intensity threshold

```

Output:

```

res <2xN cell> containing the following information for N image files:
info{1} <1x1 cell> containing sample identifiers as <1xN char>
info{2} <1x1 double> number of pixels with an intensity above TH

```

SaveMeasurements

Syntax:

```
[] = SaveMeasurements(info, labels, filename)
```

Description:
Writes image measurements performed with functions like 'CollectIntInfo', 'CollectIntInfoSIMacq' or 'PixelsAboveTH' to the comma-separated text file `filename`.

Input:

```

info <MxN cell> containing measurements for N image files:
info{1} <1x1 cell> containing sample identifiers as <1xN char>
info{2:M} <1x1 double> measurement results
labels <1xN char> containing comma-separated measurement labels for all measure-
ments included in info
filename <1xN char> complete path and filename of output file, incl. extension (e.g.
            '.txt' or '.csv')

```

A.1.2. Funktionen für 3D-Weitfeldbilder

FindSharpestPlane

Syntax:

```
[res] = FindSharpestPlane(imgStack)
```

Description:
Returns the sharpest z-plane (highest amount of structure information) in the 3D gray-scale image `imgStack`. Based on a frequency filter in the fourier domain.

Input:

```
imgStack <XxYxZ numerical> 3D image stack
```

Output:

```
res <1x1 uint> index of sharpest z-plane (1-based)
```

Batchfunktionen

DeconvolveDir

Syntax:

```
[] = DeconvolveDir(inPath, fnPattern, outPath, varargin)
```

Description:
Deconvolves all 3D images matching the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath`, using the function 'Deconvolve' and writes the results into the folder `outPath`. The result filenames are constructed from the names of the input folder, the individual input filenames and the deconvolution method (see 'Deconvolve').
Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```

inPath <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern, incl. extension; input files are named
                '*fnPattern'
outPath <1xN char> path of output folder
varargin <1xN cell> (optional): varargin = {nIter, method}
nIter <1x1 uint> number of iterations. Default: 20
method <1xN char> either 'Poisson' or 'LeastSqr' (see documentation of
                'GenericDeconvolution'). Default: 'LeastSqr'

```

Bildkorrektur**Deconvolve****Syntax:**

```
[res] = Deconvolve(filename, outPath, varargin)
```

Description:

Deconvolves the 3D grayscale image file `filename` using 'GenericDeconvolution' by Rainer Heinzmann. Deconvolution is based on a simulated psf that takes several optical parameters into account; these are hard-coded at the moment - PLEASE ADJUST FOR YOUR SETUP! (Should be read from adequate acquisition log files, someday).

Supports KDF (Khoros Data Format) and various other image formats (TIFF, BMP, JPG, GIF, PNG, ...); see documentation of MATLAB's 'imread' function for further details.

Different deconvolution methods are available and the number of iterations can be varied, using the optional `varargin` argument (see Input). Set the global variable `TestOptIt` to 1 to optimize these settings: writes the results of each iteration to a TIFF file.

Batch processing: Use 'DeconvolveDir' to process a whole folder and 'BatchFolders' to call 'DeconvolveDir' for multiple folders.

Uses CudaMat, if available (fast execution on the GPU of a graphics card that supports CUDA; toolbox by Rainer Heintzmann). See <http://www.nanoimaging.uni-jena.de/CudaMat> for further information.

Input:

```

filename <1xN char> complete path and filename of the input file, incl. extension
outPath <1xN char> OR 0 (see below).
                If TestOptIt is activated, the TIFF files for each iteration are saved in
                the folder 'DeconvolutionTest' under outPath, if outPath is a path OR the
                folder of the input file, if outPath==0
varargin <1xN cell> (optional): varargin={nIter, method, fileID}
nIter <1x1 uint> number of iterations. Default: 20
method <1xN char> either 'Poisson' or 'LeastSqr' (see documentation of
                'GenericDeconvolution'). Default: 'LeastSqr'
fileID <1xN char> output file identifier (beginning of filename). Default:
                the input filename without folder path and extension

```

Output:

```

res if outPath == 0: returns the deconvolved image stack as <XxYxZ dip_image>
                if outPath is a valid folder path: writes the result to the TIFF file
                'outPath\fileID_method_nIter.tif' and the MATLAB file
                'outPath\MATLAB\fileID_Deconvolved.mat' and returns 1 if successful or 0
                otherwise.

```

Visualisierung**ImgStack2Collage****Syntax:**

```
[res] = ImgStack2Collage(stack, columns, rows, outPath, fileID)
```

Description:

Arranges the image stack `stack` into a `columns` x `rows` collage. Ensures that all specified images are used with minimal padding:

- keeps `columns` and adjusts `rows` to fit all `N` images specified in case `rows == 0` or `columns*rows < N`
- keeps `rows` and adjusts `columns` if `columns == 0`
- shrinks `columns` and `rows` in case `columns*rows > N` to just include all `N` images, keeping the ratio `columns/rows` as good as possible
- includes black padding images in the last row in case that the final `columns*rows > N`

Input:

`stack` <YxXxZ numerical> grayscale OR <YxXxCxZ numerical> color image stack
`columns` <1x1 uint> column number preference
`rows` <1x1 uint> row number preference
`outPath` <1xN char> path of output folder OR 0
`fileID` <1xN char> output file identifier (beginning of filename)

Output:

`res` if `outPath == 0`: returns the collage. If `outPath` is a valid folder path: writes the collage to the file '`outPath\fileID_Colcolumnsxrows.tif`' and returns 1 if successful or 0 otherwise.

WriteImgs2Collage**Syntax:**

```
[res] = WriteImgs2Collage(inPath, fnPattern, outPath, columns, rows)
```

Description:

Reads TIFF files matching the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath` and arranges them into a `columns` x `rows` collage. Then scales the intensity to full dynamic range. Ensures that all specified images are used with minimal padding:

- keeps `columns` and adjusts `rows` to fit all `N` images specified in case `rows == 0` or `columns*rows < N`
- keeps `rows` and adjusts `columns` if `columns == 0`
- shrinks `columns` and `rows` in case `columns*rows > N` to just include all `N` images, keeping the ratio `columns/rows` as good as possible
- includes black padding images in the last row in case that the final `columns*rows > N`

Input:

`inPath` <1xN char> path of input folder
`fnPattern` <1xN char> filename pattern for input and output files
`outPath` <1xN char> path of output folder OR 0
`columns` <1x1 uint> column number preference
`rows` <1x1 uint> row number preference

Output:

`res` if `outPath == 0`: returns the collage as <YxX(xC) numerical>
if `outPath` is a valid folder path: writes the collage to the TIFF file '`outPath\fnPattern_Colcolumnsxrows.tif`' and returns 1 if successful or 0 otherwise.

A.1.3. Funktionen für SIM-Aufnahmen**sumImg****Syntax:**

```
[res] = sumImg(stack, r, n)
```

Description:

Combines frames in a SIM acquisition that belong to the same z-position by building their sum. Which frames to combine is defined by the number of corresponding frames in the stack `r` and the number of frames between them.

Input:

`stack` <YxXxZ numerical> image stack containing the images to add to each other
`r` <1x1 uint> number of corresponding images
`n` <1x1 uint> number of frames between an image and its next corresponding image

```
Output:
  res      <YxXxZ numerical> sum image stack
```

Batchfunktionen

BatchCorrectSIMbleach

Syntax:

```
[] = BatchCorrectSIMbleach(inPath, fnPattern, outputPath, nChannels, nDirs, nPhases, ...
    bgVal)
```

Description:

Batch function for 'CorrectSIMbleach'. Performs bleaching correction for all SIM acquisition files in the folder `inPath` that match the filename pattern `fnPattern`. Result files are written to the folder `outPath`. Also creates a plot of the mean intensities of the phase sum images before and after bleaching correction and save it in the folder `outPath` for quality control.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```
inPath      <1xN char> path of input folder
fnPattern   <1xN char> filename pattern; input files are named '*fnPattern'
outPath     <1xN char> path of output folder
funHndl     <function_handle> of the function to process in batch mode
nChannels   <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs       <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases     <1x1 uint> number of phase positions of the grating
bgVal       <1x1 double> mean camera noise value or offset that is subtracted from
every pixel before bleaching estimation (similar to the 'removeFixedBgVal'
parameter in the .parR files for the SIM reconstruction algorithm).
if bgVal == -1: the actual value is calculated from the camera noise image
(first frame in the acquisition stack); otherwise the given value is used
```

BatchCorrectSIMdrift

Syntax:

```
[] = BatchCorrectSIMdrift(inPath, fnPattern, outputPath, acqRoot, pxSizeAcq, ...
    pxSizeRecon, channels, refChannel)
```

Description:

Batch function for 'CorrectSIMdrift'. Performs drift correction for all SIM acquisition files in the folder `inPath` that match the filename pattern `fnPattern`. Result files are written to the folder `outPath`, together with a result summary and - in case of errors - an error log file.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```
inPath      <1xN char> path of input folder
fnPattern   <1x2 cell> containing 2 filename patterns as <1xN char> as follows:
fnPattern = {acqFile, reconFile} with pattern of acquisition named
acqFile    files; input files are
            '*acqFile'
reconFile  pattern of reconstructed '.mat' files; input files are named
            '*reconFile'

All patterns must include the file extension. It is expected that the
channel name defined in channels is included in the filename of the re-
constructed '.mat' files, right before reconFile.
Example: Acquisitions are named '01_SIM.kdf', '02_SIM.kdf'; channels are
'568' and '488'; reconstructions are named 'Slide1_#01_568_Results.mat',
'Slide1_#01_488_Results.mat', 'Slide1_#02_568_Results.mat',
'Slide1_#02_488_Results.mat' and so on
--> fnPattern = {'_SIM.kdf', '_Results.mat'} and channels = {'568','488'}
(as defined below)

outPath     <1xN char> path of output folder
```

```

acqRoot      <1xN char> path of folder containing all subfolders with the acquisition
              files (the images and their '.log' files)
pxSizeAcq    <1x1 numerical> pixel size of SIM acquisition in nm
pxSizeRecon  <1x1 numerical> pixel size of reconstructed images in nm
channels     <1xN cell> containing the channel names as <1xN char> in their order of
              acquisition
refChannel   <1x1 uint> 1-based index of the reference channel. All other channels
              belonging to the same acquisition are drift corrected relative to
              refChannel

```

BatchCreateResultFiles

Syntax:

```
[] = BatchCreateResultFiles(inPath, channels, outputPath)
```

Description:

Batch function that first processes 'CreateResultFiles' and subsequently 'WriteResultTiffs', thereby scaling the intensities of the TIFF stacks with the factor that scales the stack with the highest intensity to 255. Different channels of the acquisitions are processed independently. Reads the reconstruction files (*.para.mat) from the subfolders of `inPath` and writes the results to the target folder `outPath`, using the source folder name as the fileID (beginning) of the target file name. The following files are also written to `outPath`:

```

- 'CreateResultFiles_batch.log' --> progress log
- 'channel_err.log'             --> errors log (1 file/channel)
- 'channel_intRange_Sum.csv'    --> intensity information of the Sum stacks
                                (1 file/channel)
- 'channel_intRange_Res.csv'    --> intensity information of the Result stacks
                                (1 file/channel)

```

Input:

```

inPath      <1xN char> input folder containing the subfolders with the
                '*.para.mat' files
channels    <1x1 cell> containing channel names (e.g. the laser lines) as <1xN char>.
                Example: channels = {'568', '488', '404'}
outPath     <1xN char> path of output folder

```

Bildrekonstruktion

CreateResultFiles

Syntax:

```
[] = CreateResultFiles(inPath, fnPattern, outputPath, fileID)
```

Description:

Uses 'ReadParaFiles' to read 3D-SIM reconstructions (*.para.mat files) into an array, retrieves the Result and Sum image stacks and saves them to disk using 'WriteResultFiles'.

Batch processing: To process multiple folders, use 'BatchFoldersToFiles' or 'BatchCreateResultFiles' (the latter performs 'CreateResultFiles' and subsequently 'WriteResultTiffs').

Input:

```

inPath      <1xN char> input folder containing the '*.para.mat' reconstruction files
fnPattern   <1xN char> filename pattern for 'ReadParaFiles'
outPath     <1xN char> path of output folder
fileID     <1xN char> file identifier for 'WriteResultFiles'

```

GenerateParFiles

Syntax:

```
[] = GenerateParFiles(outPath, channel, zSteps, directions, phases, tmpParE, tmpParR)
```

Description:

Generates .parE and .parR parameter files needed for SIM-reconstructions, using the templates `tmpParE` and `tmpParR`:

- Fills in hard-coded values in 'tmpParE' for the parameters 'lambdaEx', 'lambda' and 'gratingperiod', depending on the laser line provided in `channel`, which can be '568', '488' or '404' at the moment - PLEASE ADJUST FOR YOUR EXPERIMENTAL SETUP! (Should be read from adequate acquisition log files, someday)
- Fills in values for 'z_val', 'directions', 'phases' and 'phase_val', provided through the input variables `zSteps`, `directions`, `nPhases` and `phases`.
- Saves the files '`channel.parE`' and '`channel.parR`' to the folder `outPath`.

Input:

```

outPath    <1xN char> path of output folder
channel    <1xN char> name of acquisition channel: currently restricted to '568',
            '488' or '404'
zSteps     <1x1 uint> number of object planes acquired in z-direction
directions <1xN numerical> grating rotations in ° (in order of acquisition)
phases     <1xN numerical> phase positions of grating in ° (in order of acquisition)
tmpParE    <1xN char> template for .parE file; read from 'tmp.parE':
            fread(fopen('tmp.parE'), inf, '*char');
tmpParR    <1xN char> template for .parR file; read from 'tmp.parR':
            fread(fopen('tmp.parR'), inf, '*char');
```

PrepareSIMrecon**Syntax:**

```
[ ] = PrepareSIMrecon(inPath, fnPattern, outPath, channels, reconEXE, update)
```

Description:

Prepares 3D-SIM acquisitions matching the filename pattern '`*fnPattern`' in the folder `inPath` for reconstruction:

- writes single-frame TIFF files for each acquired channel. The 1st image of the stack (background) is skipped.
- write adjusted .parR and .parE files for each acquired channel, based on the templates '`tmp.parR`' and '`tmp.parE`'
- writes the batch command file '`cmd.bat`', which automatically completes the reconstruction process for all prepared files

For each acquisition the '.tif', '.parR' and '.parE' files are saved in a separate subfolder within the folder `outPath`.

Batch processing: Use '`BatchFolders`' to process multiple folders.

Input:

```

inPath     <1xN char> path of input folder with 3D-SIM acquisitions
fnPattern  <1xN char> filename pattern of 3D-SIM stacks, incl. extension
            Example: filenames '01_SIM.kdf', '02_SIM.kdf' --> fnPattern = '_SIM.kdf'
outPath    <1xN char> path of output folder
channels   <1x1 cell> containing channel names (e.g. the laser lines) as <1xN char>.
            Example: channels = {'568', '488', '404'} --> TIFF files will be named
            '568_000.tif', '568_001.tif', ..., '488_000.tif', '568_001.tif' and so on.
reconEXE   <1xN char> complete path and file name of SIM reconstruction application,
            incl. '.exe'
update     Set to 1 to avoid rewriting of TIFF files (to update changes in 'tmp.parE'/
            'tmp.parR')
```

ReadParaFiles**Syntax:**

```
[paraStack] = ReadParaFiles(inPath, fileID)
```

Description:

Reads 3D-SIM reconstructions ('`*para.mat`' files) into an array.

Input:

```

inPath     <1xN char> input folder containing the '*para.mat' files
fileID     <1xN char> filename definition of the para files of one channel:
            'fileID__*_para.mat' (e.g. laser line or label name)
```

Output:

`paraStack` $\langle 1 \times 1 \times N$ `struct` \rangle structure array containing the parameters and result variables of all reconstruction files belonging to one channel of a 3D SIM acquisition

WriteResultFiles**Syntax:**

```
[] = WriteResultFiles(resStack, sumStack, outputPath, fileID)
```

Description:

Writes the Result and Sum stack from a SIM reconstruction into one MATLAB file with the filename `'fileID_Results.mat'` in the folder `outPath`. Includes the min, max, mean and sum intensities of both stacks in the variables `'intResStack'` and `'intSumStack'` and also stores these values in the global variable `'resultFile'`.

Batch processing: To process multiple folders, use `'BatchFoldersToFiles'` or `'BatchCreateResultFiles'` (the latter performs `'CreateResultFiles'` and subsequently `'WriteResultTiffs'`).

Input:

`resStack` $\langle Y \times X(xZ)$ `numerical` \rangle reconstructed Result image stack
`sumStack` $\langle Y \times X(xZ)$ `numerical` \rangle Sum image stack
`outPath` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle path of output folder
`fileID` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle file identifier (beginning of output filename)

WriteResultTiffs**Syntax:**

```
[] = WriteResultTiffs(inPath, fnPattern, outputPath, channel, maxIntRes, maxIntSum)
```

Description:

Creates Result and Sum image stacks from reconstructed SIM images in a MATLAB file saved with the function `'CreateResultFiles'`. The maximum intensities of the stacks are scaled to `maxIntRes` and `maxIntSum`, respectively and saved as TIFF files in the folder `outPath`.

Batch processing: To process multiple folders, use `'BatchFoldersToFiles'` or `'BatchCreateResultFiles'` (the latter performs `'CreateResultFiles'` and subsequently `'WriteResultTiffs'`).

Input:

`inPath` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle input folder containing the MATLAB files saved with `'CreateResultFiles'`
`fnPattern` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle filename pattern
`outPath` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle path of output folder
`channel` $\langle 1 \times N$ `char` \rangle channel identifier (typically the laser line)
`maxIntRes` $\langle 1 \times 1$ `numerical` \rangle maximum intensity for result stack scaling
`maxIntSum` $\langle 1 \times 1$ `numerical` \rangle maximum intensity for sum stack scaling

WriteResultTiffsIndividualScale**Syntax:**

```
[] = WriteResultTiffsIndividualScale(inPath, fnPattern, outputPath, channel)
```

Description:

Creates Result and Sum image stacks from reconstructed SIM images in a MATLAB file saved with the function `'CreateResultFiles'`. Negative values in the stacks are clipped, the intensities are scaled to 0-255 and the results are saved as TIFF files in the folder `'outPath\Res_0-255'` and `'outPath\Sum_0-255'`.

Batch processing: Use `'BatchFoldersToFiles'` to process multiple folders.

Input:

```

inPath    <1xN char> input folder containing the MATLAB files saved with
           'CreateResultFiles'
fnPattern <1xN char> filename pattern; input files are named '*fnPattern.mat'
outPath   <1xN char> path of output folder
channel   <1xN char> channel identifier (typically the laser line)

```

Bildkorrektur**CorrectDirToDirBleaching****Syntax:**

```
[res] = CorrectDirToDirBleaching(SIMimg, nChannels, nDirs, nPhases, bgVal)
```

Description:

Uses 'GetBleachingBtwDirs' to determine bleaching factors during a SIM-acquisition and corrects the bleaching between the corresponding Z-planes of different rotation angles of the grating (does not correct for bleaching between different Z-planes! Use 'CorrectSIMbleach' to include Z-plane-correction). Works only for acquisitions with more than one grating direction. The first image in the acquisition stack is expected to show camera noise only.

Input:

```

SIMimg    <YxXz numerical> SIM acquisition OR <1xN char> complete path and filename
           of a SIM acquisition stack
nChannels <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs     <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases   <1x1 uint> number of phase positions of the grating
bgVal     <1x1 double> mean camera noise value or offset that is subtracted from
           every pixel before bleaching estimation (similar to the 'removeFixedBgVal'
           parameter in the .parR files for the SIM reconstruction algorithm).
           if bgVal == -1: the actual value is calculated from the camera noise image
           (first frame in the acquisition stack); otherwise the given value is used

```

Output:

```
res <YxXz numerical> bleaching corrected SIM acquisition stack
```

CorrectDriftBtwChannels**Syntax:**

```
[resStacks, sumStacks, absShift] = CorrectDriftBtwChannels(SIMimg, reconFiles, ...
    resFN, refChannel)
```

Description:

Corrects mechanical drifts in x and y direction during SIM acquisitions in the associated reconstructions (Sum and Result stacks). Uses 'GetDriftBtwDirs' to determine the drift for each channel in the acquisition stack. The reconstructed stacks for each channel are aligned with the channel `refChannel` to compensate for drifts between the channels, and resulting juts are cropped in all stacks.

Please note that drifts within the stacks of each channel are not corrected here - to include z-plane-to-plane drift correction, use 'CorrectSIMdrift' instead!

Input:

```

SIMimg    <1xN char> complete path and filename of the raw SIM acquisition, incl.
           file extension
reconFiles <1xN cell> containing the complete paths and filenames of the MATLAB
           files with the reconstructions, incl. '.mat' extension as <1xN char>.
           Provide the files in the order of acquisition and make sure there is a
           reconstruction file for each acquired channel. All reconstructed stacks
           must be of the same size.
resFN     <1xN cell> containing the complete paths and filenames for the output
           files of each channel, incl. '.mat' extension as <1xN char>. Provide
           these in the order of acquisition
refChannel <1x1 uint> 1-based index defining the reference channel for stack
           alignment (in acquisition order)

```

Output:

```

resStacks <YxXxZxC single> drift corrected Result stacks; different channels are
concatenated along the 4th dimension (C) in acquisition order
sumStacks <YxXxZxC single> drift corrected Sum stacks; different channels are con-
catenated along the 4th dimension (C) in acquisition order
absShift <Cx2 double> shift in pixels found between the channels relative to
refChannel before correction (in acquisition order). absShift(:,1):
drift in x-direction, absShift(:,2): drift in y-direction

```

CorrectSIMbleach**Syntax:**

```
[res] = CorrectSIMbleach(SIMimg, nChannels, nDirs, nPhases, bgVal)
```

Description:

Uses 'GetBleachingBtwDirs' to determine bleaching factors during a SIM-acquisition and corrects the bleaching (use before reconstruction!).

First, a mean bleaching factor is calculated to correct plane-by-plane bleaching along the Z-direction, then 'CorrectDirToDirBleaching' is used to correct for remaining intensity fluctuations between the corresponding Z-planes of different grating rotations, which can be caused by unequal illumination intensities (e.g. due to polarization effects).

Works only for acquisitions with more than one grating direction. The first image in the acquisition stack is expected to show camera noise only.

Input:

```

SIMimg <YxXxZ numerical> SIM acquisition OR <1xN char> complete path and filename
of a SIM acquisition stack
nChannels <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases <1x1 uint> number of phase positions of the grating
bgVal <1x1 double> mean camera noise value or offset that is subtracted from
every pixel before bleaching estimation (similar to the 'removeFixedBgVal'
parameter in the .parR files for the SIM reconstruction algorithm).
if bgVal == -1: the actual value is calculated from the camera noise image
(first frame in the acquisition stack); otherwise the given value is used

```

Output:

```
res <YxXxZ numerical> bleaching corrected SIM acquisition stack
```

CorrectSIMdrift**Syntax:**

```
[resStacks, sumStacks, chDrift] = CorrectSIMdrift(SIMimg, reconFiles, pxSizeAcq, ...
pxSizeRecon, resFN, refChannel)
```

Description:

Corrects mechanical drifts in x and y direction during SIM acquisitions in the associated reconstructions (Sum and Result stacks). Uses 'GetDriftBtwDirs' to determine the drift for each channel in the acquisition stack. The reconstructed stacks for each channel are aligned with the channel `refChannel` to compensate for drifts between the channels, and resulting juts are cropped in all stacks. Drifts within the stacks of each channel are corrected in a similar way. The drift corrected Sum and Result stacks and the shifts found between channels before correction are saved as MATLAB files with the paths `resFN`.

Batch processing: Use 'BatchCorrectSIMdrift' to process multiple folders.

Input:

```

SIMimg <1xN char> complete path and filename of the raw SIM acquisition, incl.
file extension
reconFiles <1xN cell> containing the complete paths and filenames of the MATLAB
files with the reconstructions, including the '.mat' extension as
<1xN char>. Provide the files in the order of acquisition and make sure
there is a reconstruction file for each acquired channel. All reconstruc-
ted stacks must be of the same size.
pxSizeAcq <1x1 numerical> pixel size of SIM acquisition in nm

```

```

pxSizeRecon <1x1 numerical> pixel size of reconstructed images in nm
resFN <1xN cell> containing the complete paths and filenames for the output
files of each channel, incl. '.mat' extension as <1xN char>. Provide these
in the order of acquisition
refChannel <1x1 uint> 1-based index defining the reference channel for stack
alignment (in acquisition order)

```

Output :

```

resStacks <YxXxZxC single> drift corrected Result stacks; different channels are
concatenated along the 4th dimension (C) in acquisition order
sumStacks <YxXxZxC single> drift corrected Sum stacks; different channels are con-
catenated along the 4th dimension (C) in acquisition order
chDrift <C+1x2 double> shift in pixels found between the channels relative to
refChannel before correction (in acquisition order). chDrift(:,1):
drift in x-direction, chDrift(:,2): drift in y-direction

```

CreateDriftFig**Syntax:**

```
[fHndl] = CreateDriftFig(drift)
```

Description:

Creates a compass plot showing the drift determined in a 3D-SIM acquisition stack with 3 channels (shown in red, green, blue) and 3 grating directions. The arrows show the direction and length of the drift between grating rotation 1 and 2 (dashed lines) and 2 and 3 (solid lines) for the sharpest z-plane.

Annotation is fix at the moment - can be changed manually or included as input parameters someday...

Input :

```

drift <MxNx2 double> dirft vectors determined with the function 'GetDriftBtwDirs'
or 'GetDriftBleachBtwDirs'

```

Output :

```
fHndl <1x1 double> handle of the result figure
```

GetBleachingBtwDirs**Syntax:**

```
[bleach] = GetBleachingBtwDirs(SIMimg, nChannels, nDirs, nPhases, bgVal)
```

Description:

Determines bleaching factors during SIM-acquisition based on comparison of the Sum images over the phase shifts belonging to the same z-plane (but a different rotation angle of the grating). Works only for acquisitions with more than one grating direction.

Input :

```

SIMimg <YxXxZ numerical> SIM acquisition OR <1xN char> complete path and filename
of a SIM acquisition stack
nChannels <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases <1x1 uint> nnumber of phase positions of the grating
bgVal <1x1 numerical> mean camera noise value or offset that is subtracted from
every pixel before bleaching estimation (similar to the 'removeFixedBgVal'
parameter in the '.parR' files for the SIM reconstruction algorithm)

```

Output :

```

bleach <nChannels x zPlanes x nDirs-1 x 2 double> bleaching factors (remaining
intensity in the same z-plane of the next grating direction) for each
channel (1st dimension), each successive grating direction (2nd dimension)
and each z-plane. The factors in bleach(:, :, :, 1) are calculated based on
the maximum intensities in the whole z-plane and the factors in
bleach(:, :, :, 2) are based on the sum of all intensities in the z-plane
minus bgVal --> sum(intensities-bgVal)

```

GetDriftBleachBtwDirs**Syntax:**

```
[drift, bleach] = GetDriftBleachBtwDirs(SIMimg, nChannels, nDirs, nPhases, bgVal)
```

Description:

Determines drift and bleaching during SIM-acquisition based on comparison of the Sum images over the phase shifts belonging to the same z-plane (but a different rotation angle of the grating). Works only for acquisitions with more than one grating direction.

Input:

```
SIMimg <YxXzZ numerical> SIM acquisition OR <1xN char> complete path and filename
of a SIM acquisition stack
nChannels <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases <1x1 uint> number of phase positions of the grating
bgVal <1x1 numerical> mean camera noise value or offset that is subtracted from
every pixel before bleaching estimation (similar to the 'removeFixedBgVal'
parameter in the .parR files for the SIM reconstruction algorithm)
```

Output:

```
drift <nChannels x nDirs-1 x 2 double> drift in x (== drift(:, :, 1)) and y
(== drift(:, :, 2)) direction of the sharpest z-plane of the stack for each
channel (1st dimension) and each successive grating direction

bleach <nChannels x nDirs-1 x zPlanes x 2 double> bleaching factors (remaining
intensity in the same z-plane of the next grating direction) for each
channel (1st dimension), each successive grating direction (2nd dimension)
and each z-plane. The factors in bleach(:, :, :, 1) are calculated based on
the maximum intensities in the whole z-plane and the factors in
bleach(:, :, :, 2) are based on the sum of all intensities in the z-plane
minus bgVal --> sum(intensities-bgVal)
```

GetDriftBtwDirs**Syntax:**

```
[drift] = GetDriftBtwDirs(SIMimg, nChannels, nDirs, nPhases)
```

Description:

Determines mechanical drifts during SIM-acquisition based on comparison of the Sum images over the phase shifts belonging to the same z-plane (but a different rotation angle of the grating). Works only for acquisitions with more than one grating direction.

Input:

```
SIMimg <YxXzZ numerical> SIM acquisition OR <1xN char> complete path and filename
of a SIM acquisition stack
nChannels <1x1 uint> number of channels (different fluorophores)
nDirs <1x1 uint> number of grating directions (rotation angles)
nPhases <1x1 uint> number of phase positions of the grating
```

Output:

```
drift <nChannels x nDirs-1 x 2 double> drift in x (==drift(:, :, 1)) and y
(== drift(:, :, 2)) direction of the sharpest z-plane of the SIM stack for
each channel (1st dimension) and each successive grating direction
```

Bildanalyse**CollectIntInfoSIMacq****Syntax:**

```
[res] = CollectIntInfoSIMacq(inPath, fnPattern, outPath, channels)
```

Description:

Collects intensity information from the sum images of all SIM-acquisitions (the raw stacks, not the reconstructions) that match the filename pattern `'*fnPattern'` in the folder `inPath`. Each channel within the acquisition stack is analyzed separately. Returns the gathered information as a cell array (see Output for details) and optionally writes it to the comma-separated text files `'SIMacqSumIntInfo_channels.txt'`.
Batch processing: Use `'BatchMeasure'` to process multiple folders.

Input:

```
inPath    <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern, incl. extension; input files are named
           '*fnPattern'
outPath   <1xN char> path of output folder OR 0 if no result file should be written
channels  <1x1 cell> containing channel names as <1xN char>
```

Output:

```
res       <8xN cell> containing the following information for N image files:
info{1}   <1x1 cell> containing sample identifiers as <1xN char>
info{2}   <1x1 double> minimal intensity (darkest pixel)
info{3}   <1x1 double> mean intensity
info{4}   <1x1 double> maximal intensity (brightest pixel)
info{5}   <1x1 double> sum of all intensities
info{6}   <1x1 double> mean background intensity (calculated from the first
           image plane, which has to be a camera noise image)
info{7}   <1x1 double> number of pixels
info{8}   <1x1 double> background corrected intensity sum
```

A.1.4. Funktionen für SPDM-Aufnahmen

Batchfunktionen

BatchEvaluateFoci**Syntax:**

```
[] = BatchEvaluateFoci(inPath, fnPattern, outputPath)
```

Description:

Batch function for `'EvaluateFoci'`. Calls `'EvaluateFoci'` for all Orte matrix files in the folder `inPath`, and...

- appends the results (see `'EvaluateFoci'` documentation) as new variables to the corresponding MATLAB file with the Orte matrix
- summarizes the results in a comprehensive table that is saved to the file `'outPath\fociEvaluation.txt'`, using `'SaveMeasurements'`
- combines the next neighbor distances of all processed files (keeping `'foci'` signals and `'rest'` separate) and saves them as a table to the comma-separated text file `'outPath\mn4Dict.txt'`.
- combines the mean distances to the next 4 neighbors of all processed files (keeping `'foci'` signals and `'rest'` separate) and saves them as a table to the comma-separated textfile `'outPath\mnDict.txt'`.

Batch processing: Use `'BatchFolders'` to process multiple folders.

Input:

```
inPath    <1xN char> path of input folder
fnPattern <1xN char> filename pattern of Orte matrix files, incl. '.mat'; input
           files are named '*fnPattern'
outPath   <1xN char> path of output folder
```

OrteDriftCorrection**Syntax:**

```
[] = OrteDriftCorrection(inPath, fnPattern, outputPath, acqRoot, pxSize)
```

Description:

Corrects the mechanical drift during SPDM acquisition for all Orte matrices saved in

the specified folder. Executes the function 'CorrectDriftOrte' to perform the actual correction.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```

inPath <1xN char> path of input folder
fnPattern <1x4 cell> containing 4 filename patterns as <1xN char> as follows:
fnPattern = {orteFile, img0, img1, SPDMimgLog}
orteFile pattern of Orte matrix MATLAB file
img0 pattern of correction image acquired before the SPDM acquisition
img1 pattern of correction image acquired after the SPDM acquisition
SPDMimgLog pattern of SPDM acquisition log file
All patterns must include the file extension. Example:
fnPattern = {'_orte.mat', '_DAPI_before_SPDM.kdf', ...
'_DAPI_after_SPDM.kdf', '_SPDM.log'}
acqRoot <1xN char> path of folder containing all subfolders with the acquisition
files (image stacks and their '.log' files) the Orte matrices derive from.
The folder structure must match to the filename of the Orte matrix file.
Example: Orte file 'lh_#01_orte.mat' --> 'folder_#acqNo_...'. Path of
matching acquisition files: 'acqRoot\folder\' , or in this example
'acqRoot\lh\' , and the acquisition files are named 'acqNofnPattern{2...4}'
with fnPattern as described above (log file in this example:
'acqRoot\lh\01_SPDM.log')
outPath <1xN char> path of output folder
pxSize <1x1 numerical> pixel size of SPDM acquisition in nm

```

SPDMdriftCorrection

Syntax:

```
[] = SPDMdriftCorrection(inPath, fnPattern, outputPath, varargin)
```

Description:

Corrects the mechanical drift during SPDM acquisition for all files specified by `fnPattern` in the folder `inPath` and writes the shift corrected acquisition stack to the folder `outPath`. Executes the function 'CorrectDriftSPDM' to perform the actual correction.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```

inPath <1xN char> path of input folder
fnPattern <1x3 cell> containing 3 filename patterns as <1xN char> as
follows: fnPattern = {img0, img1, SPDMimg} with pattern of correction image
img0 acquired before the SPDM acquisition
img1 pattern of correction image acquired after the SPDM acquisition
SPDMimg pattern of SPDM acquisition
All patterns must include the file extension.
Example: fnPattern = {'_DAPI_before_SPDM.kdf', '_DAPI_after_SPDM.kdf', ...
'_SPDM.kdf'}
outPath <1xN char> path of output folder for result files
varargin <1xN cell> optional parameter for 'CorrectDriftSPDM' to set SPDM integra-
tion time in seconds, rather than reading it from the log file
'SPDMimg.log'

```

Bildkorrektur

CorrectDriftOrte

Syntax:

```
[res] = CorrectDriftOrte(t0img, t1img, SPDMintTime, orteFile, pxSize, outputPath)
```

Description:

Corrects Orte matrix for mechanical drift during SPDM acquisition, which is assumed to be linear. The drift vector is calculated based on two 2D images acquired immediately before (`t0img`) and after (`t1img`) SPDM acquisition. Samples must have an additional staining with a fluorophore that will not be detected (nor bleached out) under the SPDM

conditions, e.g. DAPI to acquire the correction images. Supports KDF (Khoros Data Format) and various other image formats (TIFF, BMP, JPG, GIF, PNG, ...); see documentation of MATLAB's 'imread' function for further details. RGB images are supported, but will be converted to grayscale for shift determination. Other color models like CMYK should not be used, as they might not be converted to grayscale correctly (mean of all samples/pixel is used for grayscale conversion). Mixing formats is possible but not recommended, as differences in bitdepth can lead to inaccuracies.

Input:

`t0img` <1xN char> complete path and filename of first image (t0)
`t1img` <1xN char> complete path and filename of second image (t1)
`SPDMintTime` <1x1 numerical> integration time of SPDM acquisition in seconds OR
<1xN char> complete path and filename of SPDM acquisition log file containing the integration time
`orteFile` <1xN char> complete path and filename of the Orte matrix
`pxSize` <1x1 numerical> pixel size of SPDM acquisition in nm
`outPath` 0 OR <1xN char> (see below)

Output:

`res` if `outPath` == 0: returns the drift corrected Orte matrix
if `outPath` is a valid folder path of type <1xN char>: writes the following files to the folder `outPath` and to subfolders of `outPath` and returns 1 if successful, or 0 otherwise:
- drift corrected Orte matrix plus additional info incl. localization images and histograms of next neighbor distances (see 'SaveSPDMres')
--> '`outPath\SPDM_filename_driftCorr.mat`'
- t0/t1 overlay images before and after drift correction (to check drift correction accuracy) --> '`outPath\SPDM_filename_driftCorrCheck.tif`'

CorrectDriftSPDM**Syntax:**

`[res] = CorrectDriftSPDM(t0img, t1img, SPDMimg, outPath, varargin)`

Description:

Corrects SPDM images for mechanical drift during acquisition, which is assumed to be linear. The drift vector is calculated based on the 2D images `t0img` and `t1img` acquired immediately before and after SPDM acquisition. Samples must have an additional staining with a fluorophore that will not be detected (nor bleached out) under the SPDM conditions, e.g. DAPI to acquire the correction images. Supports KDF (Khoros Data Format) and various other image formats (TIFF, BMP, JPG, GIF, PNG, ...); see documentation of MATLAB's 'imread' function for further details. RGB images are supported, but will be converted to grayscale for shift determination. Other color models like CMYK should not be used, as they might not be converted to grayscale correctly (mean of all samples/pixel is used for grayscale conversion). Mixing formats is possible but not recommended, as differences in bitdepths can lead to inaccuracies.

Input:

`t0img` <1xN char> complete path and filename of first image (t0)
`t1img` <1xN char> complete path and filename of second image (t1)
`SPDMimg` <1xN char> complete path and filename of SPDM acquisition
`outPath` 0 OR <1xN char> (see below)
`varargin` <1x1 numerical> (optional); can be used to set SPDM integration time in seconds, rather than reading it from the log file '`SPDMimg.log`'

Output:

`res` if `outPath` == 0: returns the drift corrected SPDM image stack as <YxXxT numerical>
if `outPath` is a valid folder path of type <1xN char>: writes the drift corrected SPDM image stack to the file '`outPath\SPDM_filename_driftCorr.kdf`'. Additionally writes '`outPath\SPDM_filename_driftCorrCheck.tif`', which contains a t0/t1 overlay image before and after drift correction for easy visual control of correct drift determination. Returns 1 if successful, or 0 otherwise

Fast_MFP**Syntax:**

```
[ ] = Fast_MFP(orteFile, outPath)
```

Description:

Loads Orte matrix from a given file and passes it to 'fast_multiframepoints'. Results are passed to the function 'saveSPDMres' to save the new Orte matrix, together with additional information.

Batch processing: Use 'BatchFilesInFolder' to process multiple files (can be combined with 'BatchFolders' to process multiple folders).

Input:

```
orteFile <1xN char> complete path and filename of the MATLAB file
              containing the Orte matrix, incl. '.mat' extension
outPath <1xN char> path of output folder
```

FilterOrte**Syntax:**

```
[res] = FilterOrte(SPDMimg, pxSizeAcq, Orte, pxSizeRes, locErrTH, intTH, ...
    locErrLowPass, intLowPass, outPath)
```

Description:

Filters an Orte matrix based on localization error and the absolute intensity of the signals within the SPDM acquisition stack. Saves the filtered Orte matrix with extra information and images.

Input:

```
SPDMimg <1xN char> complete path and filename of SPDM acquisition
pxSizeAcq <1x1 numerical> pixel size of SPDM acquisition in nm
Orte <MxN double> the Orte matrix
pxSizeRes <1x1 numerical> pixel size for images to generate from the filtered
Orte matrix
locErrTH <1xN double> localization error threshold in nm
intTH <1xN uint> intensity threshold in acquisition stack
locErrLowPass <1x1 logical> true means entries with smaller localization errors than
locErrTH survive
intLowPass <1x1 logical> true means entries with lower intensities than intTH
survive
outPath <1xN char> path of output folder
```

Output:

```
res <MxN double> the filtered Orte matrix
```

FilterOrteCol**Syntax:**

```
[res] = FilterOrteCol(Orte, col, TH, lowPass)
```

Description:

Filters an Orte matrix based on a particular column

Input:

```
Orte <MxN double> the Orte matrix
Col <1x1 uint> the filter column
TH <1x1 numerical> threshold value
lowPass <1x1 logical> true means lower values than TH survive
```

Output:

```
res <MxN double> filtered Orte matrix
```


Bildanalyse

CombineNNDist**Syntax:**

```
[nn, nn4, nn8] = CombineNNDist(inPath, fnPattern, outputPath)
```

Description:

Collects neighbor distance information in all Orte matrices specified by the filename pattern `fnPattern` in the folder `inPath` and combines it to get the typical distance profiles of replicate SPDM acquisitions. Results are returned and optionally saved as '`fnPattern_NNDist.mat`' in the folder `outPath`.

Batch processing: Use 'BatchFolders' to process multiple folders.

Input:

```
inPath      <1xN char> path of input folder
fnPattern   <1xN char> filename pattern; input files are named 'fnPattern*.mat'
outPath     <1xN char> path of output folder OR 0 if no result file should be saved
```

Output:

```
nn          <Nx1 double> next neighbor distances
nn4         <Nx1 double> mean distances to the next 4 neighbors
nn8         <Nx1 double> mean distances to the next 8 neighbors
```

EvaluateFoci**Syntax:**

```
[foci, fociStats, rest, fociMaskImg] = EvaluateFoci(Orte)
```

Description:

Uses 'Region' (by Manuel Gunkel) to search for foci (large clusters) within an Orte matrix and determines and returns various features for individual foci, all foci together and the rest of the signals outside of the foci (see Output for details). Also returns a localization image (white) overlaid with the mask that defines the individual foci (green).

Input:

```
Orte        <1xN double> the Orte matrix
```

Output:

```
foci        <1xN struct> with the following fields for each focus:
count       <1x1 double> number of signals
Orte        <Nx15 double> Orte matrix containing only the signals within
              the focus. In column 13 to 15 the distances to the next
              neighbor and the mean distances to the next 4 and next 8
              neighbors are added/updated
centerOfMass <1x2 double> center of mass, where centerOfMass(1,1) is the
              x-position and centerOfMass(1,2) is the y-position in nm
area        <1x1 double> focus area in nm^2
density     <1x1 double> focus density in singals/nm^2

fociStats   <1x1 struct> with the following fields for all foci joint:
centerOfMass <1x2 double> center of mass, where centerOfMass(1,1) is
              the x-position and centerOfMass(1,2) is the y-position
              in nm
nnDist      <Nx1 double> next neighbor distances in nm
meanNNDist  <1x1 double> mean distance to the next neighbor in nm
meanSignalCount <1x1 double> mean number of signals/focus
stdSignalCount <1x1 double> standard deviation from the mean of the
              signal counts/focus
meanArea    <1x1> double> mean focus area in nm^2
stdArea     <1x1> double> standard deviation from the mean of the
              focus areas in nm^2
meanDensity <1x1> double> mean focus density in signals/nm^2
stdDensity  <1x1> double> standard deviation from the mean of the
              focus density in signals/nm^2
```

```

rest      <1xN struct> with the following fields for signals outside of the foci:
count     <1x1 double> number of signals
Orte      <Nx15 double> Orte matrix containing only the signals outside
          of the foci. In column 13 to 15 the distances to the next
          neighbor and the mean distances to the next 4 and next 8
          neighbors are added/updated
meanNNDist <1x1 double> mean distance to the next neighbor in nm
fociMaskImg <3x1 dip_image_array> overlay image showing the localized signals as
          white pixels and the foci mask as green areas. The pixel size is equal to
          the mean localization error in Orte (x and y errors averaged).

```

getOrteInfo

Syntax:

```
[d, nLoc, meanLocErr] = getOrteInfo(Orte, pxSizeRes)
```

Description:

Shows info about an Orte matrix: number of signals, a histogram showing the x-y-averaged localization errors, the mean of all localization errors and a localization image generated with 'fastOrte2cuStdBild', using a pixel size of `pxSizeRes`.

Input:

```

Orte      <MxN double> the Orte matrix
pxSizeRes <1x1 numerical> pixel size in nm

```

Output:

```

d          <YxX uint8> localization image
nLoc       <1x1 double> number of signals in Orte
meanLocErr <1x1 double> mean of all localization errors

```

OrteFromImgMask

Syntax:

```
[innerOrte, selection] = OrteFromImgMask(Orte, mask, pxSize)
```

Description:

Filters an Orte matrix based on an image mask that represents a selection on a localization image generated from the Orte matrix using 'Orte2PunktBild' (use 'roipoly' to manually draw a selection mask)

Input:

```

Orte      <MxN double> the Orte matrix
mask      <YxX logical> binary mask
pxSize    <1x1 numerical> pixel size in nm used to generate the 'Orte2PunktBild'

```

Output:

```

innerOrte <MxN double> filtered Orte matrix containing only the
          selected entries
selection <Mx1 uint8> binary mask of selected entries in Orte

```

SaveSPDMres

Syntax:

```
[] = SaveSPDMres(orteFile, outputPath, varargin)
```

Description:

Adds the following info to the Orte matrix file `orteFile` and saves it to the folder

outputPath:

```

meanLocErr <1x1 numerical> mean xy localization accuracy (added as new variable)
gaussBild  <YxX single> localization image generated with 'fastOrte2gaussBild' (all
          events are blurred with gaussian blur using the mean localization error)
          (added as new variable)
stdBild    <YxX single> localization image generated with 'fastOrte2cuStdBild' (events
          are blurred using their individual localization error) (added as new
          variable)

```

```

NNDist      <Nx1 double> distance to the next neighbor of each event (added in column
              13 of the Orte matrix)
NN4Dist     <Nx1 double> mean distance to the next 4 neighbors of each event (added in
              column 14 of the Orte matrix)
NN8Dist     <Nx1 double> mean distance to the next 8 neighbors of each event (added in
              column 15 of the Orte matrix)

```

Additionally, the following images are saved to the indicated folders, which are generated as subfolders of `outPath`:

```

- gaussBild --> TIFF file in folder 'Orte2gaussBild'
- stdBild   --> TIFF file in folder 'Orte2cuStdBild'
- Histogram of NNDist --> EMF file in folder 'NNDist'
- Histogram of NN8Dist --> EMF file in folder 'NN8Dist'

```

Input:

```

orteFile <1xN char> complete path and filename of Orte matrix file, incl. '.mat'
outPath  <1xN char> path of output folder
varargin <1xN cell> (optional): varargin = {Orte, pxSizeRes, std}
Orte     <MxN double> Orte matrix
pxSizeRes <1x1 numerical> final pixel size for generation of localization
              images (stdBild and gaussBild); default is 20
std      <1x1 numerical> standard deviation of 2D gaussian used for
              blurring to generate the image gaussBild; default is the xy-
              mean localization error as calculated from the Orte matrix

```

Visualisierung

Orte2SymbolMap

Syntax:

```
[res] = Orte2SymbolMap(Orte, pxSizeRes, symbol)
```

Description:

Plots the points within the Orte matrix `Orte` as symbols into the image `res`, using a pixel size of `pxSizeRes` nm.

Input:

```

Orte     <MxN double> the Orte matrix
pxSizeRes <1x1 numerical> pixel size in nm
symbol   defines the marker symbol: either 'x', '+', 'o', '.', 'd' (for diamond),
              'r' (for rectangle), pairs of these (e.g. 'o.' or '.o' draws open circles
              with a dot in the center), or a 5x5 single custom pixel map

```

Output:

```
res <YxX uint8> binary result image (0 or 255)
```

ShowLocEventsCL

Syntax:

```
res = ShowLocEventsCL(SPDMimg, pxSizeAcq, Orte, varargin)
```

Description:

Marks the signal positions in an Orte matrix as red pixels in the corresponding SPDM acquisition stack. Optionally color codes signals from different clusters if a cluster mask image and its pixel size is provided.

Input:

```

SPDMimg <1xN char> complete path and filename of acquisition stack OR the stack
              itself as <YxXxT numerical>
pxSizeAcq <1x1 numerical> pixel size of SPDM acquisition in nm
Orte     <MxN double> Orte matrix

```

```

varargin <1x2 cell> (optional):
varargin = {clusterMask, pxSizeCl}
clusterMask <YxX uint> cluster mask image where different clusters are
                labeled by different intensity (pixels of the same cluster
                have the same intensity)
pxSizeCl <1x1 double> pixel size of clusterMask in nm

```

Output:

```
res <3x1 dip_image_array> SPDM acquisition stack with marked Orte positions
```

A.1.5. Funktionen zur Kombination von SIM- und SPDM-Aufnahmen

BatchSaveOrteSIM

Syntax:

```
[] = BatchSaveOrteSIM(dataSheet, SIMpath, SPDMpath, outputPath)
```

Description:

Saves an Orte matrix and its matching plane in a 3D-SIM image into one MATLAB file in the folder `SPDMpath`. Reads the filenames of the input MATLAB files are read from an Excel data sheet based on the template 'Acquisition_log.xlsx'.

Input:

```

dataSheet <1xN char> complete path and filename of the Excel file
SIMpath <1xN char> path of the folder containing the MATLAB files with the SIM-
                reconstructions. Please note that this function extracts the z-plane from
                the 3D-SIM stack that matches the plane of the SPDM-acquisition without
                taking drift between the acquisitions into account - use 'CombineSIMspdm'
                to get the exact plane with subpixel accuracy
SPDMpath <1xN char> path of the folder containing the MATLAB files
                with the Orte matrices
outPath <1xN char> path of output folder

```

CombineSIMspdm

Syntax:

```
[] = CombineSIMspdm(simResultFile, Orte, triImg, fileID, SIMplanes, SPDMpxSize, ...
                    SIMpxSize, outputPath)
```

Description:

Combines localization images and their matching planes in the Result and Sum stack of a 3D-SIM reconstruction. Uses the functions 'MatchImgSizes' and 'CorrectShiftMatchZ' to align the images and saves the following images into the folder `outPath` as TIFF files and additionally as variables in the MATLAB file 'fileID_SIMspdm.mat':

- 'resTri': triangulation image, shifted and cropped to match 'resResImg'
- 'resResImg': size adjusted interpolated plane from `resStack` that matches the triangulation image after shifting
- 'combResTri': combination of 'resTri' (gray) and 'resResImg' (red)
- 'resSumImg': size adjusted interpolated plane from `sumStack` that matches the triangulation image after shifting
- 'combSumTri': combination of 'resTri' (gray) and 'resSumImg' (red)
- 'OrtePunktBild': point representation of localized SPDM events, shifted and cropped to match 'resResImg'
- 'combResOrte': combination of 'OrtePunktBild' (gray) and 'resResImg' (red)

Input:

```

simResultFile <1xN char> complete path and filename of a SIM result file created with
                'WriteResultFiles', incl. '.mat' (MATLAB file containing the variables
                'resStack' and 'sumStack')
Orte <MxN double> Orte matrix OR <1xN char> complete path and filename of
                Orte matrix file, incl. '.mat'
triImg <MxN numerical> triangulation image generated from the Orte matrix OR
                <1xN char> complete path and filename of the triangulation image file,
                incl. extension (several formats are supported, see 'imread' documenta-
                tion). The 'LMVis' tool by David Baddeley can be used to generate tri-

```

	angulation images
<code>fileID</code>	<code><1xN char></code> output file identifier (beginning of the filenames)
<code>SIMplanes</code>	<code><1xN uint></code> can be used to specify a subset of planes in the SIM images to accelerate z-matching with localization images. Set 0 to include the whole stacks
<code>SPDMpxSize</code>	<code><1x1 double></code> pixel size of triangulation image in nm (will be used for generation of result images)
<code>SIMpxSize</code>	<code><1x1 double></code> pixel size of SIM images in nm
<code>outPath</code>	<code><1xN char></code> path of output folder

A.2. Fits der DSB-Reparaturkinetik in Abschnitt 4.2.1

Zur Charakterisierung der DSB-Reparaturkinetik anhand des γ H2AX-Signals wurden die Ergebnisse der FACS-Messungen zwischen 0 und 4 h nach Bestrahlung mit Photonen oder ^{12}C -Ionen verwendet um mit Hilfe der MATLAB Curve Fitting Toolbox Fitfunktionen gemäß Gleichung (A.1) zu berechnen.

$$i(t) = \frac{p_1 t^2 + p_2 t}{t^2 + q_1 t + q_2} \quad | \quad t \geq 0, p_1 < 0, p_2, q_1, q_2 > 0 \quad \begin{array}{l} i \\ t \\ p_1, p_2, q_1, q_2 \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{Intensität} \\ \text{Zeit} \\ \text{Konstanten} \end{array} \quad (\text{A.1})$$

Aus den Fits wurden mit Hilfe der MATLAB-Funktion `AnalyzeDSBrepairKinetics` einige für die Reparaturkinetik charakteristische Kenngrößen bestimmt:

AnalyzeDSBrepairKinetics

Syntax:

```
[res] = AnalyzeDSBrepairKinetics(varargin)
```

Description:

Calculates characteristic values that describe the kinetics of DNA repair after ionizing radiation as measured by FACS analysis of a DSB marker. The function 'i(t) = (p1*t^2+p2*t)/(t^2+q2*t+q3) | t>0, p1<0, p2,q1,q2>0' is used to fit experimental data representing fluorescence intensities i at different time points t (should include an unirradiated control sample for t=0. Intensity should be background corrected by subtracting the level of the control sample).

Input:

```
varargin <1x1 cell> containing a <cfit> object created with the Curve Fitting
Toolbox ('cftools') using the given fit function OR <2x1 cell> containing
the raw time lapse data:
varargin{1} <Nx1 numerical> timepoints t
varargin{2} <Nx1 numerical> Intensities i
varargin{1} and varargin{2} must be paired and must have the same size
```

Output:

```
res <1x1 struct> with the following fields (values calculated based on deter-
mined fit function):
tMAX <1x1 double> time point of maximum intensity
t50 <1x1 double> time point of half maximum intensity within
repair phase (after tMAX)
dtMAX50 <1x1 double> half-value period (period between tMAX and t50
iMAX <1x1 double> maximum intensity reached
mVrepA <1x1 double> mean absolute repair velocity between tMAX and
t50 as delta i/time unit
mVrepR <1x1 double> mean repair velocity between tMAX and t50
relative to iMAX as percent/time unit
```

Die Funktionsgleichungen der Fits und ihr Bestimmtheitsgrad (Ausgaben der Curve Fitting Toolbox), sowie die abgeleiteten Kenngrößen sind nachfolgend aufgeführt.

1 Gy Zeitreihen

Alle Zellen	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-8990	-82,09
p2	5,03e+04	401,3
q2	46,16	0,0868
q3	31,12	0,3907
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	507,1	106,5
R ²	0,9974	0,9982
Adj. R ²	0,9935	0,9956
RMSE	15,92	7,298
Kenngrößen:		
tMAX (h)	1,3290	0,5460
t50 (h)	3,8473	1,6755
dtMAX50 (h)	2,5183	1,1295
iMAX	540,8930	264,3798
mVrepA (di/h)	107,3920	117,0375
mVrepR (%/h)	19,85	44,27

G2	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-342,5	-59,05
p2	1973	238,8
q2	2,115	2,29e-09
q3	1,183	0,2438
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	174,7	2562
R ²	0,9985	0,944
Adj. R ²	0,9962	0,9066
RMSE	9,346	29,22
Kenngrößen:		
tMAX (h)	0,7921	0,4371
t50 (h)	2,7645	1,3185
dtMAX50 (h)	1,9724	0,8814
iMAX	386,5912	214,0820
mVrepA (di/h)	98,0024	121,4452
mVrepR (%/h)	25,35	56,73

G1	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-1,25e+04	-253,8
p2	7,08e+04	1295
q2	49,68	2,041
q3	39,68	0,7903
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	989,6	1,955
R ²	0,9966	1
Adj. R ²	0,9916	0,9999
RMSE	22,24	0,9886
Kenngrößen:		
tMAX (h)	1,4233	0,6488
t50 (h)	3,9600	2,3896
dtMAX50 (h)	2,5367	1,7408
iMAX	671,3690	289,2329
mVrepA (di/h)	132,3314	83,0751
mVrepR (%/h)	19,71	28,72

M	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-632,2	-642,5
p2	1491	1286
q2	1,68e-11	2,76e-09
q3	0,9737	0,5705
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	1067	2,83e+04
R ²	0,9973	0,9553
Adj. R ²	0,9955	0,9255
RMSE	18,86	97,09
Kenngrößen:		
tMAX (h)	0,6569	0,5223
t50 (h)	1,5033	1,2266
dtMAX50 (h)	0,8464	0,7043
iMAX	503,0040	588,6395
mVrepA (di/h)	297,1363	417,8896
mVrepR (%/h)	59,07	70,99

S	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-1,43e+04	-52,87
p2	9,18e+04	191
q2	130,2	1,81e-08
q3	79,33	0,2431
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	256,5	1065
R ²	0,9973	0,9632
Adj. R ²	0,9932	0,9081
RMSE	11,33	23,07
Kenngrößen:		
tMAX (h)	1,4344	0,4303
t50 (h)	4,3791	1,2726
dtMAX50 (h)	2,9447	0,8423
iMAX	381,3758	169,0419
mVrepA (di/h)	64,7564	100,3476
mVrepR (%/h)	16,98	59,36

4 Gy Zeitreihen

Alle Zellen	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	- 3208	- 1917
p2	2,56e+04	1,11e+04
q2	10,61	7,599
q3	3,167	1,23
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	2509	847,1
R ²	0,9984	0,9989
Adj. R ²	0,996	0,9972
RMSE	35,42	20,58
Kenngößen:		
tMAX (h)	1,0074	0,6429
t50 (h)	4,2825	2,9976
dtMAX50 (h)	3,2751	2,3547
iMAX	1,51e+03	970,2752
mVrepA (di/h)	231,0068	206,0284
mVrepR (%/h)	15,27	21,23

G1	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-8,97e+06	-1,74e+06
p2	6,39e+07	9,72e+06
q2	2,24e+04	6482
q3	8046	1003
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	7431	3427
R ²	0,9967	0,9962
Adj. R ²	0,9916	0,9905
RMSE	60,95	41,4
Kenngößen:		
tMAX (h)	1,2801	0,7871
t50 (h)	4,6675	3,4894
dtMAX50 (h)	3,3874	2,7023
iMAX	1,83e+03	1,08e+03
mVrepA (di/h)	269,7447	199,0891
mVrepR (%/h)	14,76	18,50

S	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-14,84	-457,3
p2	2354	3302
q2	0,6673	2,775
q3	0,5011	0,4001
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	258,9	349,4
R ²	0,9997	0,9992
Adj. R ²	0,9992	0,9981
RMSE	11,38	13,22
Kenngößen:		
tMAX (h)	0,7033	0,4990
t50 (h)	3,2781	2,6344
dtMAX50 (h)	2,5749	2,1354
iMAX	1,13e+03	754,0863
mVrepA (di/h)	218,4621	176,5714
mVrepR (%/h)	19,42	23,42

G2	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-73,31	-749,5
p2	2804	4326
q2	0,8168	3,062
q3	0,4667	0,4703
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	609,3	1409
R ²	0,9994	0,9979
Adj. R ²	0,9986	0,9947
RMSE	17,45	26,54
Kenngößen:		
tMAX (h)	0,6641	0,5037
t50 (h)	3,1158	2,4387
dtMAX50 (h)	2,4517	1,9350
iMAX	1,26e+03	877,6220
mVrepA (di/h)	257,3331	226,7754
mVrepR (%/h)	20,39	25,84

M	¹² C-Ionen	Photonen
Koeffizienten:		
p1	-24,15	-0,0002
p2	1,40e+04	1,05e+04
q2	5,477	4,325
q3	0,4138	1,024
Bestimmtheitsgrad:		
SSE	1,18e+04	2,63e+04
R ²	0,9962	0,9862
Adj. R ²	0,9904	0,9655
RMSE	76,94	114,6
Kenngößen:		
tMAX (h)	0,6396	1,0119
t50 (h)	7,8287	8,2480
dtMAX50 (h)	7,1892	7,2362
iMAX	2,06e+03	1,66e+03
mVrepA (di/h)	143,5378	114,4984
mVrepR (%/h)	6,95	6,91

A.3. Analyse der Signaldistanzen in den SPDM-Daten aus Abschnitt 4.3.2 im Vergleich zu Zufallsverteilungen

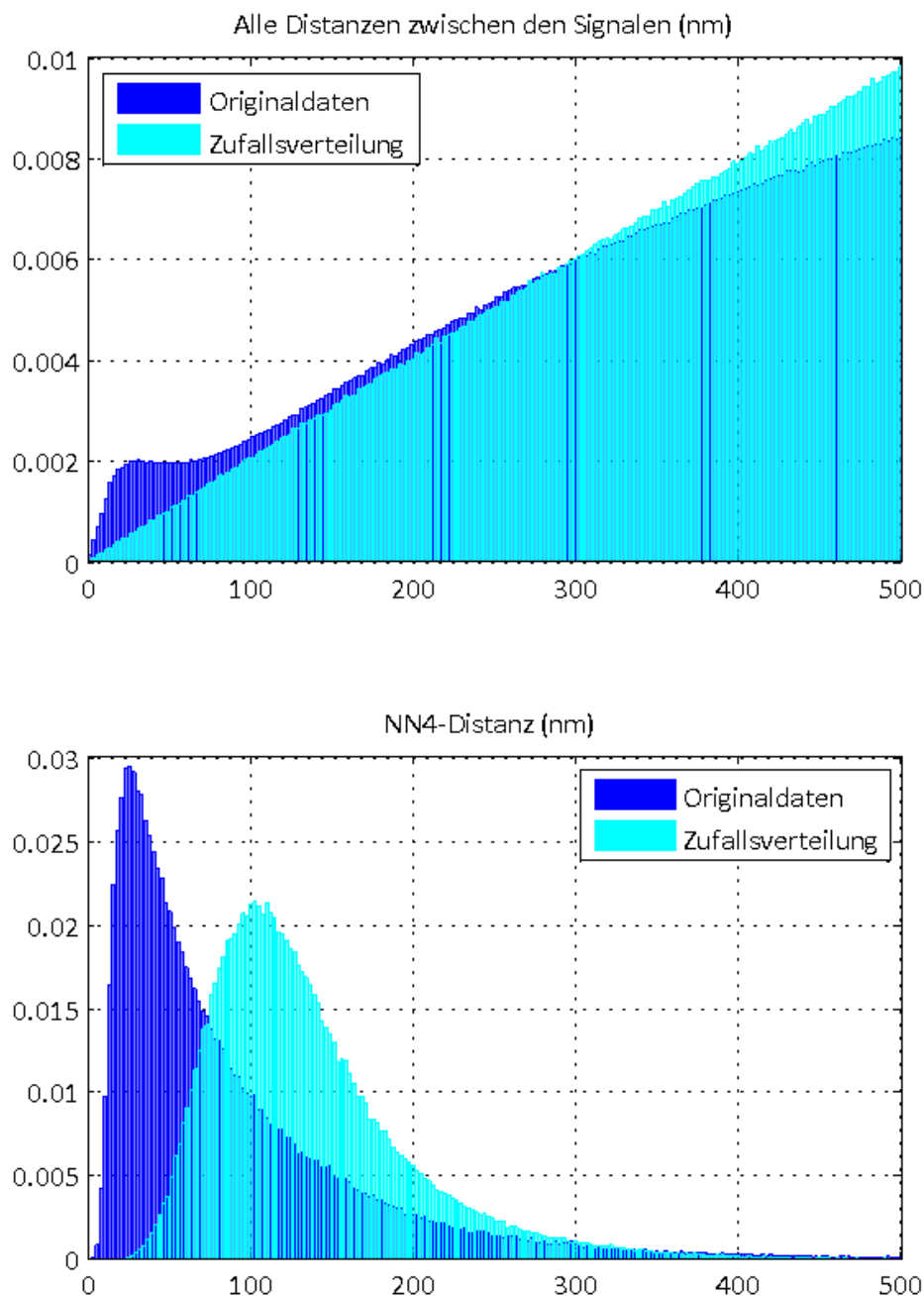


Abbildung A.1. | γ H2AX-Signale in SPDM-Daten im Vergleich zu Zufallsverteilungen. Oben: Histogramm aller Distanzen zwischen den Signalen. Unten: Mittlere Distanzen zu den 4 nächsten Nachbarn. Die Histogramme repräsentieren je eine Messreihe aus allen SPDM-Aufnahmen aus Abschnitt 4.3.2 (blau) und allen entsprechenden Zufallsverteilungen (cyan).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] KRIEGER, Hanno: *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 2. Teubner, 2007. – 366 S.
- [2] KRIEGER, Hanno: *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 2. Teubner, 2007. – 158 ff S.
- [3] SWORDY, S.P.: The Energy Spectra and Anisotropies of Cosmic Rays. In: *Space Science Reviews* 99 (2001), Nr. 1-4, 85-94. <http://dx.doi.org/10.1023/A:3A1013828611730>. – ISSN 0038–6308
- [4] FOKAS, Emmanouil ; KRAFT, Gerhard ; AN, Hanxiang ; ENGENHART-CABILLIC, Rita: Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1796 (2009), Nr. 2, 216 - 229. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X09000523>. – ISSN 0304–419X
- [5] KRIEGER, Hanno: *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. 2. Teubner, 2007
- [6] STONE, R. S.: Neutron therapy and specific ionization. In: *Am J Roentgenol Radium Ther* 59 (1948), Jun, Nr. 6, S. 771–785
- [7] TOBIAS, C. A. ; BLAKELY, E. A. ; ALPEN, E. L. ; CASTRO, J. R. ; AINSWORTH, E. J. ; CURTIS, S. B. ; NGO, F. Q. ; RODRIGUEZ, A. ; ROOTS, R. J. ; TENFORDE, T. ; YANG, T. C.: Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 (1982), Dec, Nr. 12, S. 2109–2120
- [8] GADEMANN, G. ; HARTMANN, G. H. ; KRAFT, G. ; LORENZ, W. J. ; WANNENMACHER, M.: The medical heavy ion therapy project at the Gesellschaft für Schwerionenforschung facility in Darmstadt. In: *Strahlenther Onkol* 166 (1990), Jan, Nr. 1, S. 34–39
- [9] SCHULZ-ERTNER, Daniela ; NIKOGHOSYAN, Anna ; THILMANN, Christoph ; HABERER, Thomas ; JÄKEL, Oliver ; KARGER, Christian ; KRAFT, Gerhard ; WANNENMACHER, Michael ; DEBUS, Jürgen: Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004), Feb, Nr. 2, S. 631–640
- [10] KRAFT, Gerhard: [Heavy ion tumor therapy]. In: *Med Monatsschr Pharm* 32 (2009), Sep, Nr. 9, S. 328–334
- [11] HABERER, Th ; DEBUS, J. ; EICKHOFF, H. ; JÄKEL, O. ; SCHULZ-ERTNER, D. ; WEBER, U.: The Heidelberg Ion Therapy Center. In: *Radiother Oncol* 73 Suppl 2 (2004), Dec, S. S186–S190
- [12] COMBS, Stephanie E. ; JÄKEL, Oliver ; HABERER, Thomas ; DEBUS, Jürgen: Particle therapy at the Heidelberg Ion Therapy Center (HIT) - Integrated research-driven university-hospital-based radiation oncology service in Heidelberg, Germany. In: *Radiother Oncol* 95 (2010), Apr, Nr. 1, 41–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2010.02.016>
- [13] CHRISTEN, Philipp ; JAUSSI, Rolf: *Biochemie*. 1. Springer, 2005 (Springer-Lehrbuch). – 120–122 S.
- [14] CICCIA, Alberto ; ELLEDGE, Stephen J.: The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. In: *Molecular Cell* 40 (2010), Nr. 2, 179 - 204. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276510007471>. – ISSN 1097–2765
- [15] SETLOW, R. B. ; CARRIER, W. L. ; BOLLUM, F. J.: Pyrimidine dimers in UV-irradiated poly dI:dC. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 53 (1965), May, Nr. 5, S. 1111–1118
- [16] BEEHLER, B. C. ; PRZYBYSZEWSKI, J. ; BOX, H. B. ; KULESZ-MARTIN, M. F.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H2O2. In: *Carcinogenesis* 13 (1992), Nov, Nr. 11, S. 2003–2007
- [17] WARD, J. F.: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. In: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35 (1988), S. 95–125
- [18] JONES, G. D. ; BOSWELL, T. V. ; LEE, J. ; MILLIGAN, J. R. ; WARD, J. F. ; WEINFELD, M.: A comparison of DNA damages produced under conditions of direct and indirect action of radiation. In: *Int J Radiat Biol* 66 (1994), Nov, Nr. 5, S. 441–445
- [19] WARD, John F.: Ionizing Radiation Damage to DNA. Version: 1999. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4865-2_35. In: DIZDAROGLU, Miral (Hrsg.) ; KARAKAYA, AliEsat (Hrsg.): *Advances in DNA Damage and Repair* Bd. 302. Springer US, 1999. – ISBN 978–1–4613–7207–3, 431–439
- [20] WARD, J. F.: The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. In: *Int J Radiat Biol* 66 (1994), Nov, Nr. 5, S. 427–432

- [21] SUTHERLAND, B. M. ; BENNETT, P. V. ; SIDORKINA, O. ; LAVAL, J.: Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Jan, Nr. 1, S. 103–108
- [22] GOODHEAD, D. T.: The initial physical damage produced by ionizing radiations. In: *Int J Radiat Biol* 56 (1989), Nov, Nr. 5, S. 623–634
- [23] HADA, Megumi ; GEORGAKILAS, Alexandros G.: Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. In: *J Radiat Res (Tokyo)* 49 (2008), May, Nr. 3, S. 203–210
- [24] SCHIPLER, Agnes ; ILIAKIS, George: DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. In: *Nucleic Acids Res* 41 (2013), Sep, Nr. 16, 7589–7605. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt556>
- [25] UNNO, Junya ; TAKAGI, Masatoshi ; PIAO, Jinhua ; SUGIMOTO, Masataka ; HONDA, Fumiko ; MAEDA, Daisuke ; MASUTANI, Mitsuko ; KIYONO, Tohru ; WATANABE, Fumiaki ; MORIO, Tomohiro ; TERAOKA, Hirobumi ; MIZUTANI, Shuki: Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. In: *Cancer Sci* 104 (2013), Jun, Nr. 6, 703–710. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12144>
- [26] LONGHESE, Maria P.: DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. In: *Genes Dev* 22 (2008), Jan, Nr. 2, 125–140. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1626908>
- [27] ENSMINGER, Michael ; ILOFF, Lucie ; EBEL, Christian ; NIKOLOVA, Teodora ; KAINA, Bernd ; LÖBRICH, Markus: DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. In: *J Cell Biol* 206 (2014), Jul, Nr. 1, 29–43. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201312078>
- [28] HAINCE, Jean-François ; MCDONALD, Darin ; RODRIGUE, Amélie ; DÉRY, Ugo ; MASSON, Jean-Yves ; HENDZEL, Michael J. ; POIRIER, Guy G.: PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Jan, Nr. 2, 1197–1208. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706734200>
- [29] SHIBATA, Atsushi ; MOIANI, Davide ; ARVAI, Andrew S. ; PERRY, Jefferson ; HARDING, Shane M. ; GENOIS, Marie-Michelle ; MAITY, Ranjan ; VAN ROSSUM-FIKKERT, Sari ; KERTOKALIO, Aryandi ; ROMOLI, Filippo ; ISMAIL, Amani ; ISMALAJ, Ermal ; PETRICCI, Elena ; NEALE, Matthew J. ; BRISTOW, Robert G. ; MASSON, Jean-Yves ; WYMAN, Claire ; JEGGO, Penny A. ; TAINER, John A.: DNA Double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. In: *Mol Cell* 53 (2014), Jan, Nr. 1, 7–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.003>
- [30] HOPFNER, Karl-Peter ; CRAIG, Lisa ; MONCALIAN, Gabriel ; ZINKEL, Robert A. ; USUI, Takehiko ; OWEN, Barbara A L. ; KARCHER, Annette ; HENDERSON, Brendan ; BODMER, Jean-Luc ; MCMURRAY, Cynthia T. ; CARNEY, James P. ; PETRINI, John H J. ; TAINER, John A.: The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. In: *Nature* 418 (2002), Aug, Nr. 6897, 562–566. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00922>
- [31] BAKKENIST, Christopher J. ; KASTAN, Michael B.: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (2003), Jan, Nr. 6922, 499–506. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01368>
- [32] LEE, Ji-Hoon ; PAULL, Tanya T.: Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. In: *Science* 304 (2004), Apr, Nr. 5667, 93–96. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1091496>
- [33] SHIOTANI, Bunsyo ; ZOU, Lee: Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. In: *Mol Cell* 33 (2009), Mar, Nr. 5, 547–558. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.024>
- [34] BONNER, William M. ; REDON, Christophe E. ; DICKEY, Jennifer S. ; NAKAMURA, Asako J. ; SEDELNIKOVA, Olga A. ; SOLIER, Stéphanie ; POMMIER, Yves: GammaH2AX and cancer. In: *Nat Rev Cancer* 8 (2008), Dec, Nr. 12, 957–967. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2523>
- [35] BYUN, Tony S. ; PACEK, Marcin ; YEE, Muh-ching ; WALTER, Johannes C. ; CIMPRICH, Karlene A.: Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. In: *Genes Dev* 19 (2005), May, Nr. 9, 1040–1052. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1301205>
- [36] ZOU, Lee ; ELLEDGE, Stephen J.: Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. In: *Science* 300 (2003), Jun, Nr. 5625, 1542–1548. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1083430>
- [37] KUMAGAI, Akiko ; LEE, Joon ; YOO, Hae Y. ; DUNPHY, William G.: TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. In: *Cell* 124 (2006), Mar, Nr. 5, 943–955. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.041>
- [38] STIFF, Tom ; CEROSALETTI, Karen ; CONCANNON, Patrick ; O'DRISCOLL, Mark ; JEGGO, Penny A.: Replication independent ATR signalling leads to G2/M arrest requiring Nbs1, 53BP1 and MDC1. In: *Hum Mol Genet* 17 (2008), Oct, Nr. 20, 3247–3253. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn220>

- [39] ROGAKOU, E. P. ; PILCH, D. R. ; ORR, A. H. ; IVANOVA, V. S. ; BONNER, W. M.: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Mar, Nr. 10, S. 5858–5868
- [40] PARK, Eun-Jung ; CHAN, Doug W. ; PARK, Ji-Hye ; OETTINGER, Marjorie A. ; KWON, Jongbum: DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Dec, Nr. 23, S. 6819–6827
- [41] FRIESNER, Joanna D. ; LIU, Bo ; CULLIGAN, Kevin ; BRITT, Anne B.: Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. In: *Mol Biol Cell* 16 (2005), May, Nr. 5, 2566–2576. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-10-0890>
- [42] PAULL, T. T. ; ROGAKOU, E. P. ; YAMAZAKI, V. ; KIRCHGESSNER, C. U. ; GELLERT, M. ; BONNER, W. M.: A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. In: *Curr Biol* 10 (2000), Nr. 15, S. 886–895
- [43] WEST, M. H. ; BONNER, W. M.: Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. In: *Biochemistry (Mosc)* 19 (1980), Jul, Nr. 14, S. 3238–3245
- [44] ROGAKOU, E. P. ; BOON, C. ; REDON, C. ; BONNER, W. M.: Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. In: *J Cell Biol* 146 (1999), Sep, Nr. 5, S. 905–916
- [45] NAKAMURA, Asako J. ; RAO, V. A. ; POMMIER, Yves ; BONNER, William M.: The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. In: *Cell Cycle* 9 (2010), Jan, Nr. 2, S. 389–397
- [46] KOBAYASHI, Junya: Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT domain. In: *J Radiat Res (Tokyo)* 45 (2004), Dec, Nr. 4, S. 473–478
- [47] MARTI, Thomas M. ; HEFNER, Eli ; FEENEY, Luzviminda ; NATALE, Valerie ; CLEAVER, James E.: H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), Jun, Nr. 26, 9891–9896. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0603779103>
- [48] HANASOGE, Sheela ; LJUNGMAN, Mats: H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. In: *Carcinogenesis* 28 (2007), Nov, Nr. 11, 2298–2304. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgm157>
- [49] STASZEWSKI, Ori ; NIKOLOVA, Teodora ; KAINA, Bernd: Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. In: *Environ Mol Mutagen* 49 (2008), Dec, Nr. 9, 734–740. <http://dx.doi.org/10.1002/em.20430>
- [50] MATSUOKA, S. ; ROTMAN, G. ; OGAWA, A. ; SHILOH, Y. ; TAMAI, K. ; ELLEDGE, S. J.: Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000), Sep, Nr. 19, 10389–10394. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.190030497>
- [51] LIU, Q. ; GUNTUKU, S. ; CUI, X. S. ; MATSUOKA, S. ; CORTEZ, D. ; TAMAI, K. ; LUO, G. ; CARATTINI-RIVERA, S. ; DEMAYO, F. ; BRADLEY, A. ; DONEHOWER, L. A. ; ELLEDGE, S. J.: Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. In: *Genes Dev* 14 (2000), Jun, Nr. 12, S. 1448–1459
- [52] BUSINO, Luca ; CHIESA, Massimo ; DRAETTA, Giulio F. ; DONZELLI, Maddalena: Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. In: *Oncogene* 23 (2004), Mar, Nr. 11, 2050–2056. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207394>
- [53] TAKIZAWA, Catherine G. ; MORGAN, David O.: Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. In: *Current Opinion in Cell Biology* 12 (2000), Nr. 6, 658 - 665. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067400001496>. – ISSN 0955–0674
- [54] BRODERICK, Ronan ; NASHEUER, Heinz-Peter: Regulation of Cdc45 in the cell cycle and after DNA damage. In: *Biochem Soc Trans* 37 (2009), Aug, Nr. Pt 4, 926–930. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0370926>
- [55] SHIEH, S. Y. ; AHN, J. ; TAMAI, K. ; TAYA, Y. ; PRIVES, C.: The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. In: *Genes Dev* 14 (2000), Feb, Nr. 3, S. 289–300
- [56] DEIRY, W. S. ; TOKINO, T. ; VELCULESCU, V. E. ; LEVY, D. B. ; PARSONS, R. ; TRENT, J. M. ; LIN, D. ; MERCER, W. E. ; KINZLER, K. W. ; VOGELSTEIN, B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (1993), Nov, Nr. 4, S. 817–825

- [57] CHOWDHURY D FAU KEOGH, Michael-Christopher ; KEOGH MC FAU ISHII, Haruhiko ; ISHII H FAU PETERSON, Craig L. ; PETERSON CL FAU BURATOWSKI, Stephen ; BURATOWSKI S FAU LIEBERMAN, Judy ; J, Lieberman: gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. (2005), Nr. 1097-2765 (Linking)
- [58] CHOWDHURY, Dipanjan ; XU, Xingzhi ; ZHONG, Xueyan ; AHMED, Fariyal ; ZHONG, Jianing ; LIAO, Ji ; DYKXHOORN, Derek M. ; WEINSTOCK, David M. ; PFEIFER, Gerd P. ; LIEBERMAN, Judy: A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. In: *Mol Cell* 31 (2008), Jul, Nr. 1, 33–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.016>
- [59] CHA, Hyukjin ; LOWE, Julie M. ; LI, Henghong ; LEE, Ji-Seon ; BELOVA, Galina I. ; BULAVIN, Dmitry V. ; FORNACE, Albert J. Jr: Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. In: *Cancer Res* 70 (2010), May, Nr. 10, 4112–4122. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4244>
- [60] KAINA, B. ; CHRISTMANN, M.: DNA-Schadensantwort und ihre pharmakologische Beeinflussung. In: *Der Onkologe* 17 (2011), Nr. 6, 503–512. <http://dx.doi.org/10.1007/s00761-011-2028-6>
- [61] LU, Xiongbin ; MA, Ou ; NGUYEN, Thuy-Ai ; JONES, Stephen N. ; OREN, Moshe ; DONEHOWER, Lawrence A.: The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. In: *Cancer Cell* 12 (2007), Oct, Nr. 4, 342–354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.033>
- [62] BATCHELOR, Eric ; LOEWER, Alexander ; LAHAV, Galit: The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. In: *Nat Rev Cancer* 9 (2009), May, Nr. 5, 371–377. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2604>
- [63] ROTHKAMM, Kai ; LÖBRICH, Markus: Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003), Apr, Nr. 9, 5057–5062. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0830918100>
- [64] SEDELNIKOVA, Olga A. ; ROGAKOU, Emmy P. ; PANYUTIN, Igor G. ; BONNER, William M.: Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. In: *Radiat Res* 158 (2002), Oct, Nr. 4, S. 486–492
- [65] MACPHAIL, S. H. ; BANÁTH, J. P. ; YU, T. Y. ; CHU, E. H. M. ; LAMBUR, H. ; OLIVE, P. L.: Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. In: *Int J Radiat Biol* 79 (2003), May, Nr. 5, S. 351–358
- [66] HUANG, Xuan ; HALICKA, H. D. ; TRAGANOS, Frank ; TANAKA, Toshiki ; KUROSE, Akira ; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew: Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. In: *Cell Prolif* 38 (2005), Aug, Nr. 4, 223–243. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.2005.00344.x>
- [67] HAMASAKI, Kanya ; IMAI, Kazue ; NAKACHI, Kei ; TAKAHASHI, Norio ; KODAMA, Yoshiaki ; KUSUNOKI, Yoichiro: Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. In: *Environ Mol Mutagen* 48 (2007), Jan, Nr. 1, 38–47. <http://dx.doi.org/10.1002/em.20273>
- [68] RÜBE, Claudia E. ; GRUDZENSKI, Saskia ; KÜHNE, Martin ; DONG, Xiaorong ; RIEF, Nicole ; LÖBRICH, Markus ; RÜBE, Christian: DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. In: *Clin Cancer Res* 14 (2008), Oct, Nr. 20, 6546–6555. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5147>
- [69] BHOGAL, Nirmal ; KASPLER, Pavel ; JALALI, Farid ; HYRIEN, Ollivier ; CHEN, Rui ; HILL, Richard P. ; BRISTOW, Robert G.: Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. In: *Radiat Res* 173 (2010), Jan, Nr. 1, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1667/RR1851.1>
- [70] DICKEY, Jennifer S. ; REDON, Christophe E. ; NAKAMURA, Asako J. ; BAIRD, Brandon J. ; SEDELNIKOVA, Olga A. ; BONNER, William M.: H2AX: functional roles and potential applications. In: *Chromosoma* 118 (2009), Dec, Nr. 6, 683–692. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-009-0234-4>
- [71] REDON, Christophe E. ; NAKAMURA, Asako J. ; MARTIN, Olga A. ; PAREKH, Palak R. ; WEYEMI, Urbain S. ; BONNER, William M.: Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. In: *Aging (Albany NY)* 3 (2011), Feb, Nr. 2, S. 168–174
- [72] HOCHHAUSER, Daniel ; MEYER, Timothy ; SPANSWICK, Victoria J. ; WU, Jenny ; CLINGEN, Peter H. ; LOADMAN, Paul ; COBB, Margaret ; GUMBRELL, Lindsey ; BEGENT, Richard H. ; HARTLEY, John A. ; JODRELL, Duncan: Phase I study of sequence-selective minor groove DNA binding agent SJG-136 in patients with advanced solid tumors. In: *Clin Cancer Res* 15 (2009), Mar, Nr. 6, 2140–2147. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1315>

- [73] BARNARD, S. ; AINSBURY, E. A. ; AL-HAFIDH, J. ; HADJIDEKOVA, V. ; HRISTOVA, R. ; LINDHOLM, C. ; MONTEIRO GIL, O. ; MOQUET, J. ; MORENO, M. ; RÖSSLER, U. ; THIERENS, H. ; VANDEVOORDE, C. ; VRAL, A. ; WOJEWÓDZKA, M. ; ROTHKAMM, K.: The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European Biodosimetry Network RENE. In: *Radiat Prot Dosimetry* (2014), Aug. <http://dx.doi.org/10.1093/rpd/ncu259>
- [74] GENT, D. C. ; BURG, M. van d.: Non-homologous end-joining, a sticky affair. In: *Oncogene* 26 (2007), Dec, Nr. 56, 7731–7740. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210871>
- [75] LIEBER, Michael R.: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annu Rev Biochem* 79 (2010), 181–211. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- [76] MALU, Shruti ; MALSHETTY, Vidyasagar ; FRANCIS, Dailia ; CORTES, Patricia: Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. In: *Immunol Res* 54 (2012), Dec, Nr. 1-3, 233–246. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z>
- [77] WALKER, J. R. ; CORPINA, R. A. ; GOLDBERG, J.: Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. In: *Nature* 412 (2001), Aug, Nr. 6847, 607–614. <http://dx.doi.org/10.1038/35088000>
- [78] DEFAZIO, Lisa G. ; STANSEL, Rachel M. ; GRIFFITH, Jack D. ; CHU, Gilbert: Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. In: *EMBO J* 21 (2002), Jun, Nr. 12, 3192–3200. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf299>
- [79] MEEK, Katheryn ; DOUGLAS, Pauline ; CUI, Xiaoping ; DING, Qi ; LEES-MILLER, Susan P.: trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. In: *Mol Cell Biol* 27 (2007), May, Nr. 10, 3881–3890. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02366-06>
- [80] BUDMAN, Joe ; CHU, Gilbert: Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. In: *EMBO J* 24 (2005), Feb, Nr. 4, 849–860. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600563>
- [81] ROY, Sunetra ; ANDRES, Sara N. ; VERGNES, Alexandra ; NEAL, Jessica A. ; XU, Yao ; YU, Yaping ; LEES-MILLER, Susan P. ; JUNOP, Murray ; MODESTI, Mauro ; MEEK, Katheryn: XRCC4's interaction with XLF is required for coding (but not signal) end joining. In: *Nucleic Acids Res* 40 (2012), Feb, Nr. 4, 1684–1694. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr1315>
- [82] MLADENOV, Emil ; MAGIN, Simon ; SONI, Aashish ; ILIAKIS, George: DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. In: *Front Oncol* 3 (2013), 113. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00113>
- [83] WANG, Huichen ; PERRAULT, Ange R. ; TAKEDA, Yoshihiko ; QIN, Wei ; WANG, Hongyan ; ILIAKIS, George: Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Sep, Nr. 18, S. 5377–5388
- [84] ILIAKIS, George: Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. In: *Radiother Oncol* 92 (2009), Sep, Nr. 3, 310–315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.024>
- [85] DECOTTIGNIES, Anabelle: Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. In: *Frontiers in Genetics* 4 (2013), Nr. 48. http://www.frontiersin.org/cancer_genetics/10.3389/fgene.2013.00048/abstract. – ISSN 1664–8021
- [86] MIMITOU, Eleni P. ; SYMINGTON, Lorraine S.: DNA end resection: many nucleases make light work. In: *DNA Repair (Amst)* 8 (2009), Sep, Nr. 9, 983–995. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.017>
- [87] LLORENTE, Bertrand ; SMITH, Catherine E. ; SYMINGTON, Lorraine S.: Break-induced replication: what is it and what is it for? In: *Cell Cycle* 7 (2008), Apr, Nr. 7, S. 859–864
- [88] BENSON, F. E. ; BAUMANN, P. ; WEST, S. C.: Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. In: *Nature* 391 (1998), Jan, Nr. 6665, 401–404. <http://dx.doi.org/10.1038/34937>
- [89] WEST, Stephen C.: Molecular views of recombination proteins and their control. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003), Jun, Nr. 6, 435–445. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1127>
- [90] SIGURDSSON, Stefan ; VAN KOMEN, Stephen ; PETUKHOVA, Galina ; SUNG, Patrick: Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nov, Nr. 45, 42790–42794. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M208004200>
- [91] SARBAJNA, Shriparna ; WEST, Stephen C.: Holliday junction processing enzymes as guardians of genome stability. In: *Trends Biochem Sci* 39 (2014), Sep, Nr. 9, 409–419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.07.003>

- [92] LI, Xuan ; HEYER, Wolf-Dietrich: Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. In: *Cell Res* 18 (2008), Jan, Nr. 1, 99–113. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.1>. – ISSN 1001–0602
- [93] JEGGO, Penny A. ; GEUTING, Verena ; LÖBRICH, Markus: The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. In: *Radiother Oncol* 101 (2011), Oct, Nr. 1, 7–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.019>
- [94] GEUTING, Verena ; REUL, Christian ; LÖBRICH, Markus: ATM release at resected double-strand breaks provides heterochromatin reconstitution to facilitate homologous recombination. In: *PLoS Genet* 9 (2013), Nr. 8, e1003667. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003667>
- [95] SHIBATA, Atsushi ; CONRAD, Sandro ; BIRRAUX, Julie ; GEUTING, Verena ; BARTON, Olivia ; ISMAIL, Amani ; KAKAROUGKAS, Andreas ; MEEK, Katheryn ; TAUCHER-SCHOLZ, Gisela ; LÖBRICH, Markus ; JEGGO, Penny A.: Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. In: *EMBO J* 30 (2011), Mar, Nr. 6, 1079–1092. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.27>
- [96] ESCRIBANO-DÍAZ, Cristina ; ORTHWEIN, Alexandre ; FRADET-TURCOTTE, Amélie ; XING, Mengtan ; YOUNG, Jordan T F. ; TKÁČ, Ján ; COOK, Michael A. ; ROSEBROCK, Adam P. ; MUNRO, Meagan ; CANNY, Marella D. ; XU, Dongyi ; DUROCHER, Daniel: A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CTIP controls DNA repair pathway choice. In: *Mol Cell* 49 (2013), Mar, Nr. 5, 872–883. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>
- [97] ZHOU, Yi ; PAULL, Tanya T.: DNA-dependent protein kinase regulates DNA end resection in concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and ataxia telangiectasia-mutated (ATM). In: *J Biol Chem* 288 (2013), Dec, Nr. 52, 37112–37125. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.514398>
- [98] KUMAR, Ramesh ; CHEOK, Chit F.: RIF1: A novel regulatory factor for DNA replication and DNA damage response signaling. In: *DNA Repair (Amst)* (2014), Jan. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.12.004>
- [99] GOODARZI, Aaron A. ; NOON, Angela T. ; DECKBAR, Dorothee ; ZIV, Yael ; SHILOH, Yosef ; LÖBRICH, Markus ; JEGGO, Penny A.: ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. In: *Mol Cell* 31 (2008), Jul, Nr. 2, 167–177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.017>
- [100] CORTEZ, D. ; WANG, Y. ; QIN, J. ; ELLEDGE, S. J.: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. In: *Science* 286 (1999), Nov, Nr. 5442, S. 1162–1166
- [101] SVILAR, David ; GOELLNER, Eva M. ; ALMEIDA, Karen H. ; SOBOL, Robert W.: Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. In: *Antioxid Redox Signal* 14 (2011), Jun, Nr. 12, 2491–2507. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3466>
- [102] HOEIJMAKERS, J. H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. In: *Nature* 411 (2001), May, Nr. 6835, 366–374. <http://dx.doi.org/10.1038/35077232>
- [103] ROBERTSON, A. B. ; KLUNGLAND, A. ; ROGNES, T. ; LEIROS, I.: DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. In: *Cell Mol Life Sci* 66 (2009), Mar, Nr. 6, 981–993. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>
- [104] OEI, S. L. ; ZIEGLER, M.: ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). In: *J Biol Chem* 275 (2000), Jul, Nr. 30, S. 23234–23239
- [105] RECHKUNOVA, N. I. ; LAVRIK, O. I.: Nucleotide excision repair in higher eukaryotes: mechanism of primary damage recognition in global genome repair. In: *Subcell Biochem* 50 (2010), 251–277. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-3471-7_13
- [106] MELIS, Joost P M. ; LUIJTEN, Mirjam ; MULLENDERS, Leon H F. ; VAN STEEG, Harry: The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage. In: *Mutat Res* 728 (2011), Nr. 3, 107–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.07.001>
- [107] WANG, Qi-En ; ZHU, Qianzheng ; WANI, Gulzar ; CHEN, Jianming ; WANI, Altaf A.: UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. In: *Carcinogenesis* 25 (2004), Jun, Nr. 6, 1033–1043. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh085>
- [108] HANAWALT, Philip C. ; SPIVAK, Graciela: Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), Dec, Nr. 12, 958–970. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2549>
- [109] HOEIJMAKERS, Jan H J.: DNA damage, aging, and cancer. In: *N Engl J Med* 361 (2009), Oct, Nr. 15, 1475–1485. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0804615>

- [110] FUSS, Jill O. ; TAINER, John A.: XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. In: *DNA Repair (Amst)* 10 (2011), Jul, Nr. 7, 697–713. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.028>
- [111] GLICKMAN, B. W. ; RADMAN, M.: Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (1980), Feb, Nr. 2, S. 1063–1067
- [112] GORMAN, Jason ; WANG, Feng ; REDDING, Sy ; PLYS, Aaron J. ; FAZIO, Teresa ; WIND, Shalom ; ALANI, Eric E. ; GREENE, Eric C.: Single-molecule imaging reveals target-search mechanisms during DNA mismatch repair. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (2012), Nov, Nr. 45, E3074–E3083. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1211364109>
- [113] KADYROV, Farid A. ; DZANTIEV, Leonid ; CONSTANTIN, Nicoleta ; MODRICH, Paul: Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. In: *Cell* 126 (2006), Jul, Nr. 2, 297–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.039>
- [114] ZHANG, Yanbin ; YUAN, Fenghua ; PRESNELL, Steven R. ; TIAN, Keli ; GAO, Yin ; TOMKINSON, Alan E. ; GU, Liya ; LI, Guo-Min: Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. In: *Cell* 122 (2005), Sep, Nr. 5, 693–705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.027>
- [115] CONSTANTIN, Nicoleta ; DZANTIEV, Leonid ; KADYROV, Farid A. ; MODRICH, Paul: Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. In: *J Biol Chem* 280 (2005), Dec, Nr. 48, 39752–39761. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509701200>
- [116] HONDA, Masayoshi ; OKUNO, Yusuke ; HENGEL, Sarah R. ; MARTÍN-LÓPEZ, Juana V. ; COOK, Christopher P. ; AMUNUGAMA, Ravindra ; SOUKUP, Randal J. ; SUBRAMANYAM, Shyamal ; FISHEL, Richard ; SPIES, Maria: Mismatch repair protein hMSH2-hMSH6 recognizes mismatches and forms sliding clamps within a D-loop recombination intermediate. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 111 (2014), Jan, Nr. 3, E316–E325. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1312988111>
- [117] RADA, C. ; EHRENSTEIN, M. R. ; NEUBERGER, M. S. ; MILSTEIN, C.: Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. In: *Immunity* 9 (1998), Jul, Nr. 1, S. 135–141
- [118] WIESENDANGER, M. ; KNEITZ, B. ; EDELMANN, W. ; SCHARFF, M. D.: Somatic hypermutation in MutS homologue (MSH)3-, MSH6-, and MSH3/MSH6-deficient mice reveals a role for the MSH2-MSH6 heterodimer in modulating the base substitution pattern. In: *J Exp Med* 191 (2000), Feb, Nr. 3, S. 579–584
- [119] CROWN, K N. ; MCMAHAN, Susan ; SEKELSKY, Jeff: Eliminating Both Canonical and Short-Patch Mismatch Repair in Drosophila melanogaster Suggests a New Meiotic Recombination Model. In: *PLoS Genet* 10 (2014), Sep, Nr. 9, e1004583. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004583>
- [120] OSTROWSKI, L. E. ; VON WRONSKI, M. A. ; BIGNER, S. H. ; RASHEED, A. ; SCHOLD, SC Jr ; BRENT, T. P. ; MITRA, S. ; BIGNER, D. D.: Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in malignant human glioma cell lines. In: *Carcinogenesis* 12 (1991), Sep, Nr. 9, S. 1739–1744
- [121] JAGGER, J.: Photoreactivation. In: *Bacteriol Rev* 22 (1958), Jun, Nr. 2, S. 99–142
- [122] KATO, T Jr ; TODO, T. ; AYAKI, H. ; ISHIZAKI, K. ; MORITA, T. ; MITRA, S. ; IKENAGA, M.: Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. In: *Nucleic Acids Res* 22 (1994), Oct, Nr. 20, S. 4119–4124
- [123] NICOLAY, Nils H. ; HELLEDAY, Thomas ; SHARMA, Ricky A.: Biological relevance of DNA polymerase β and translesion synthesis polymerases to cancer and its treatment. In: *Curr Mol Pharmacol* 5 (2012), Jan, Nr. 1, S. 54–67
- [124] BLANCA, Giuseppina ; VILLANI, Giuseppe ; SHEVELEV, Igor ; RAMADAN, Kristijan ; SPADARI, Silvio ; HÜBSCHER, Ulrich ; MAGA, Giovanni: Human DNA polymerases lambda and beta show different efficiencies of translesion DNA synthesis past abasic sites and alternative mechanisms for frameshift generation. In: *Biochemistry (Mosc)* 43 (2004), Sep, Nr. 36, 11605–11615. <http://dx.doi.org/10.1021/bi049050x>
- [125] PRAKASH, Satya ; PRAKASH, Louise: Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. In: *Genes Dev* 16 (2002), Aug, Nr. 15, 1872–1883. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1009802>
- [126] FRIEDBERG, Errol C. ; LEHMANN, Alan R. ; FUCHS, Robert P P.: Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? In: *Mol Cell* 18 (2005), May, Nr. 5, 499–505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.032>
- [127] MCCULLOCH, Scott D. ; KOKOSKA, Robert J. ; KUNKEL, Thomas A.: Efficiency, fidelity and enzymatic switching during translesion DNA synthesis. In: *Cell Cycle* 3 (2004), May, Nr. 5, S. 580–583
- [128] GONZALEZ-HUICI, Victor ; SZAKAL, Barnabas ; URULANGODI, Madhusoodanan ; PSAKHYE, Ivan ; CASTELLUCCI, Federica ; MENOLFI, Demis ; RAJAKUMARA, Eerappa ; FUMASONI, Marco ; BERMEJO, Rodrigo ; JENTSCH, Stefan ; BRANZEI, Dana: DNA bending facilitates the error-free DNA damage tolerance pathway and upholds genome integrity. In: *EMBO J* 33 (2014), Feb, Nr. 4, 327–340. <http://dx.doi.org/10.1002/emboj.201387425>

- [129] GIANNATTASIO, Michele ; ZWICKY, Katharina ; FOLLONIER, Cindy ; FOIANI, Marco ; LOPES, Massimo ; BRANZEI, Dana: Visualization of recombination-mediated damage bypass by template switching. In: *Nat Struct Mol Biol* (2014), Sep. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2888>
- [130] CHATRATH, P. ; SCOTT, I. S. ; MORRIS, L. S. ; DAVIES, R. J. ; BIRD, K. ; VOWLER, S. L. ; COLEMAN, N.: Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. In: *Br J Cancer* 95 (2006), Aug, Nr. 3, 314–321. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603262>
- [131] SOLIER, Stéphanie ; POMMIER, Yves: MDC1 cleavage by caspase-3: a novel mechanism for inactivating the DNA damage response during apoptosis. In: *Cancer Res* 71 (2011), Feb, Nr. 3, 906–913. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3297>
- [132] OBERST, Andrew ; POP, Cristina ; TREMBLAY, Alexandre G. ; BLAIS, Véronique ; DENAULT, Jean-Bernard ; SALVESEN, Guy S. ; GREEN, Douglas R.: Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. In: *J Biol Chem* 285 (2010), May, Nr. 22, 16632–16642. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.095083>
- [133] STEFANI, Ioanna C. ; WRIGHT, Daniel ; POLIZZI, Karen M. ; KONTORAVDI, Cleo: The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. In: *Curr Alzheimer Res* 9 (2012), Mar, Nr. 3, S. 373–387
- [134] ZONG, Wei-Xing ; LI, Chi ; HATZIVASSILIOU, Georgia ; LINDSTEN, Tullia ; YU, Qian-Chun ; YUAN, Junying ; THOMPSON, Craig B.: Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. In: *J Cell Biol* 162 (2003), Jul, Nr. 1, 59–69. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302084>
- [135] NAKAGAWA, T. ; YUAN, J.: Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. In: *J Cell Biol* 150 (2000), Aug, Nr. 4, S. 887–894
- [136] DE LA CADENA, Selene G. ; HERNÁNDEZ-FONSECA, Karla ; CAMACHO-ARROYO, Ignacio ; MASSIEU, Lourdes: Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. In: *Apoptosis* 19 (2014), Mar, Nr. 3, 414–427. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-013-0930-7>
- [137] LI, Jianze ; LEE, Brenda ; LEE, Amy S.: Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Mar, Nr. 11, 7260–7270. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509868200>
- [138] REGGIORI, Fulvio ; KLIONSKY, Daniel J.: Autophagy in the eukaryotic cell. In: *Eukaryot Cell* 1 (2002), Feb, Nr. 1, S. 11–21
- [139] MIZUSHIMA, Noboru ; KOMATSU, Masaaki: Autophagy: renovation of cells and tissues. In: *Cell* 147 (2011), Nov, Nr. 4, 728–741. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- [140] LIBERSKI, Pawel P. ; SIKORSKA, Beata ; BRATOSIEWICZ-WASIK, Jolanta ; GAJDUSEK, D C. ; BROWN, Paul: Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. In: *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004), Dec, Nr. 12, 2473–2490. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.016>
- [141] CODOGNO, P. ; MEIJER, A. J.: Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. In: *Cell Death Differ* 12 Suppl 2 (2005), Nov, 1509–1518. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401751>
- [142] ORENSTEIN, Samantha J. ; CUERVO, Ana M.: Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. In: *Semin Cell Dev Biol* 21 (2010), Sep, Nr. 7, 719–726. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.02.005>
- [143] LI, Wen-wen ; LI, Jian ; BAO, Jin-ku: Microautophagy: lesser-known self-eating. In: *Cell Mol Life Sci* 69 (2012), Apr, Nr. 7, 1125–1136. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>
- [144] RAVIKUMAR, Brinda ; FUTTER, Marie ; JAHREISS, Luca ; KOROLCHUK, Viktor I. ; LICHTENBERG, Maïke ; LUO, Shouqing ; MASSEY, Dunecan C O. ; MENZIES, Fiona M. ; NARAYANAN, Usha ; RENNA, Maurizio ; JIMENEZ-SANCHEZ, Maria ; SARKAR, Sovan ; UNDERWOOD, Benjamin ; WINSLOW, Ashley ; RUBINSZTEIN, David C.: Mammalian macroautophagy at a glance. In: *J Cell Sci* 122 (2009), Jun, Nr. Pt 11, 1707–1711. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.031773>
- [145] MIZUSHIMA, Noboru ; YOSHIMORI, Tamotsu ; OHSUMI, Yoshinori: The role of Atg proteins in autophagosome formation. In: *Ann Rev Cell Dev Biol* 27 (2011), 107–132. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- [146] ALERS, Sebastian ; LÖFFLER, Antje S. ; WESSELBORG, Sebastian ; STORK, Björn: Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. In: *Mol Cell Biol* 32 (2012), Jan, Nr. 1, 2–11. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06159-11>
- [147] PARK, Kyung-Jin ; LEE, Seung-Hyun ; LEE, Chang-Han ; JANG, Ji-Young ; CHUNG, Junho ; KWON, Myung-Hee ; KIM, Yong-Sung: Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. In: *Biochem Biophys Res Commun* 382 (2009), May, Nr. 4, 726–729. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.095>

- [148] OTOMO, Chinatsu ; METLAGEL, Zoltan ; TAKAESU, Giichi ; OTOMO, Takanori: Structure of the human ATG12 ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. In: *Nat Struct Mol Biol* 20 (2013), Jan, Nr. 1, 59–66. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2431>
- [149] HAYFLICK, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. In: *Exp Cell Res* 37 (1965), Mar, S. 614–636
- [150] SHERWOOD, S. W. ; RUSH, D. ; ELLSWORTH, J. L. ; SCHIMKE, R. T.: Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988), Dec, Nr. 23, S. 9086–9090
- [151] DIMRI, G. P. ; LEE, X. ; BASILE, G. ; ACOSTA, M. ; SCOTT, G. ; ROSKELLEY, C. ; MEDRANO, E. E. ; LINSKENS, M. ; RUBELJ, I. ; PEREIRA-SMITH, O.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995), Sep, Nr. 20, S. 9363–9367
- [152] GERDES, J. ; SCHWAB, U. ; LEMKE, H. ; STEIN, H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. In: *Int J Cancer* 31 (1983), Jan, Nr. 1, S. 13–20
- [153] MAO, Zhiyong ; KE, Zhongle ; GORBUNOVA, Vera ; SELUANOV, Andrei: Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. In: *Aging (Albany NY)* 4 (2012), Jun, Nr. 6, S. 431–435
- [154] ROSSBERGER, Sabrina ; BEST, Gerrit ; BADDELEY, David ; HEINTZMANN, Rainer ; BIRK, Udo ; DITHMAR, Stefan ; CREMER, Christoph: Combination of structured illumination and single molecule localization microscopy in one setup. In: *Journal of Optics* 15 (2013), Nr. 9, 094003. <http://stacks.iop.org/2040-8986/15/i=9/a=094003>
- [155] CREMER, Christoph ; MASTERS, Barry R.: Resolution enhancement techniques in microscopy. In: *The European Physical Journal H* 38 (2013), Nr. 3, 281-344. <http://dx.doi.org/10.1140/epjh/e2012-20060-1>. – ISSN 2102-6459
- [156] ABBE, E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. In: *Archiv für mikroskopische Anatomie* 9 (1873), Nr. 1, 413-418. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02956173>. – ISSN 0176-7364
- [157] LEMMER, P. ; GUNKEL, M. ; BADDELEY, D. ; KAUFMANN, R. ; URICH, A. ; WEILAND, Y. ; REYMANN, J. ; MÜLLER, P. ; HAUSMANN, M. ; CREMER, C.: SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. In: *Applied Physics B* 93 (2008), Nr. 1, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1007/s00340-008-3152-x>. – ISSN 0946-2171
- [158] LEMMER, P. ; GUNKEL, M. ; WEILAND, Y. ; MÜLLER, P. ; BADDELEY, D. ; KAUFMANN, R. ; URICH, A. ; EIPEL, H. ; AMBERGER, R. ; HAUSMANN, M. ; CREMER, C.: Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. In: *J Microsc* 235 (2009), Aug, Nr. 2, 163–171. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03196.x>
- [159] KAUFMANN, Rainer ; LEMMER, Paul ; GUNKEL, Manuel ; WEILAND, Yanina ; MÜLLER, Patrick ; HAUSMANN, Michael ; BADDELEY, David ; AMBERGER, Roman ; CREMER, Christoph: SPDM: single molecule superresolution of cellular nanostructures. In: *Proc. SPIE* 7185 (2009), 71850J-71850J-19. <http://dx.doi.org/10.1117/12.809109>
- [160] DICKSON, R. M. ; CUBITT, A. B. ; TSIEN, R. Y. ; MOERNER, W. E.: On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. In: *Nature* 388 (1997), Jul, Nr. 6640, 355–358. <http://dx.doi.org/10.1038/41048>
- [161] SINNECKER, Daniel ; VOIGT, Philipp ; HELLWIG, Nicole ; SCHAEFER, Michael: Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. In: *Biochemistry (Mosc)* 44 (2005), May, Nr. 18, 7085–7094. <http://dx.doi.org/10.1021/bi047881x>
- [162] HEILEMANN, Mike ; LINDE, Sebastian van d. ; MUKHERJEE, Anindita ; SAUER, Markus: Super-resolution imaging with small organic fluorophores. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (2009), Nr. 37, 6903–6908. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200902073>
- [163] BADDELEY, David ; CANNELL, Mark B. ; SOELLER, Christian: Visualization of localization microscopy data. In: *Microsc Microanal* 16 (2010), Feb, Nr. 1, 64–72. <http://dx.doi.org/10.1017/S143192760999122X>
- [164] HEILEMANN, Mike ; VAN DE LINDE, Sebastian ; SCHÜTTPELZ, Mark ; KASPER, Robert ; SEEFELDT, Britta ; MUKHERJEE, Anindita ; TINNEFELD, Philip ; SAUER, Markus: Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008), Nr. 33, 6172–6176. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200802376>
- [165] HEINTZMANN, Rainer ; CREMER, Christoph G.: Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In: *Proc. SPIE* 3568 (1999), 185-196. <http://dx.doi.org/10.1117/12.336833>

- [166] GUSTAFSSON, Mats G L.: Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005), Sep, Nr. 37, 13081–13086. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406877102>
- [167] KARADAGLIĆ, Dejan ; WILSON, Tony: Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy. In: *Micron* 39 (2008), Oct, Nr. 7, 808–818. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2008.01.017>
- [168] BEST, Gerrit ; AMBERGER, Roman ; BADDELEY, David ; ACH, Thomas ; DITHMAR, Stefan ; HEINTZMANN, Rainer ; CREMER, Christoph: Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue. In: *Micron* (2010), Sep. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.016>
- [169] GUSTAFSSON, M. G.: Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. In: *J Microsc* 198 (2000), May, Nr. Pt 2, S. 82–87
- [170] GUSTAFSSON, Mats G L. ; SHAO, Lin ; CARLTON, Peter M. ; WANG, C J R. ; GOLUBOVSKAYA, Inna N. ; CANDE, W Z. ; AGARD, David A. ; SEDAT, John W.: Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. In: *Biophys J* 94 (2008), Jun, Nr. 12, 4957–4970. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.120345>
- [171] HEINTZMANN, Rainer ; BENEDETTI, Pier A.: High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. In: *Appl Opt* 45 (2006), Jul, Nr. 20, S. 5037–5045
- [172] WICKER, Kai ; MANDULA, Ondrej ; BEST, Gerrit ; FIOLOKA, Reto ; HEINTZMANN, Rainer: Phase optimisation for structured illumination microscopy. In: *Opt Express* 21 (2013), Jan, Nr. 2, S. 2032–2049
- [173] PONTÉN, J. ; MACINTYRE, E. H.: Long term culture of normal and neoplastic human glia. In: *Acta Pathol Microbiol Scand* 74 (1968), Nr. 4, S. 465–486
- [174] CLARK, Michael J. ; HOMER, Nils ; O'CONNOR, Brian D. ; CHEN, Zugen ; ESKIN, Ascia ; LEE, Hane ; MERRIMAN, Barry ; NELSON, Stanley F.: U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. In: *PLoS Genet* 6 (2010), Jan, Nr. 1, e1000832. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000832>
- [175] JACOBS, J. P. ; JONES, C. M. ; BAILLE, J. P.: Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. In: *Nature* 227 (1970), Jul, Nr. 5254, S. 168–170
- [176] SCHMITT, Markus ; PAWLITA, Michael: High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations. In: *Nucleic Acids Res* (2009), Jul. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp581>
- [177] HOROWITZ, Y. S. ; MOSCOVITCH, M.: Highlights and pitfalls of 20 years of application of computerised glow curve analysis to thermoluminescence research and dosimetry. In: *Radiat Prot Dosimetry* 153 (2013), Jan, Nr. 1, 1–22. <http://dx.doi.org/10.1093/rpd/ncs242>
- [178] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), May, S. 248–254
- [179] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–685
- [180] NICOLETTI, I. ; MIGLIORATI, G. ; PAGLIACCI, M. C. ; GRIGNANI, F. ; RICCARDI, C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. In: *J Immunol Methods* 139 (1991), Jun, Nr. 2, S. 271–279
- [181] DEAN, P. N. ; JETT, J. H.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. In: *J Cell Biol* 60 (1974), Feb, Nr. 2, S. 523–527
- [182] FOX, M. H.: A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry. In: *Cytometry* 1 (1980), Jul, Nr. 1, 71–77. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990010114>
- [183] SCHINDELIN, Johannes ; ARGANDA-CARRERAS, Ignacio ; FRISE, Erwin ; KAYNIG, Verena ; LONGAIR, Mark ; PIETZSCH, Tobias ; PREIBISCH, Stephan ; RUEDEN, Curtis ; SAALFELD, Stephan ; SCHMID, Benjamin ; TINEVEZ, Jean-Yves ; WHITE, Daniel J. ; HARTENSTEIN, Volker ; ELICEIRI, Kevin ; TOMANCAK, Pavel ; CARDONA, Albert: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nat Methods* 9 (2012), Jul, Nr. 7, 676–682. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- [184] BOLTE, S. ; CORDELIÈRES, F. P.: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. In: *J Microsc* 224 (2006), Dec, Nr. Pt 3, 213–232. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- [185] SHEETS, Kristopher G. ; JUN, Bokkyoo ; ZHOU, Yongdong ; WINKLER, Jeremy ; ZHU, Min ; PETASIS, Nicos ; GORDON, William C. ; BAZAN, Nicolas G.: Topical Neuroprotectin D1 Attenuates Experimental CNV And Induces Activated Microglia Redistribution. In: *ARVO Meeting Abstracts* 52 (2011), Nr. 6, 5470. <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/52/6/5470>

- [186] SCHMID, Benjamin ; SCHINDELIN, Johannes ; CARDONA, Albert ; LONGAIR, Mark ; HEISENBERG, Martin: A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. In: *BMC Bioinformatics* 11 (2010), 274. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-274>
- [187] PENG, Hanchuan ; RUAN, Zongcai ; LONG, Fuhui ; SIMPSON, Julie H. ; MYERS, Eugene W.: V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets. In: *Nat Biotechnol* 28 (2010), Apr, Nr. 4, 348–353. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1612>
- [188] DECKBAR, Dorothee ; JEGGO, Penny A. ; LÖBRICH, Markus: Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. In: *Crit Rev Biochem Mol Biol* 46 (2011), Aug, Nr. 4, 271–283. <http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2011.575764>
- [189] EDELBROCK, Michael A. ; KALIYAPERUMAL, Saravanan ; WILLIAMS, Kandace J.: DNA mismatch repair efficiency and fidelity are elevated during DNA synthesis in human cells. In: *Mutat Res* 662 (2009), Mar, Nr. 1-2, 59–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.006>
- [190] WU, Xue-Song ; XIN, Li ; YIN, Wen-Xuan ; SHANG, Xi-Ying ; LU, Lu ; WATT, Rory M. ; CHEAH, Kathryn S E. ; HUANG, Jian-Dong ; LIU, De-Pei ; LIANG, Chih-Chuan: Increased efficiency of oligonucleotide-mediated gene repair through slowing replication fork progression. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2005), Feb, Nr. 7, 2508–2513. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0406991102>
- [191] MORRISON, Ashby J. ; SHEN, Xuetong: DNA repair in the context of chromatin. In: *Cell Cycle* 4 (2005), Apr, Nr. 4, S. 568–571
- [192] MURGA, Matilde ; JACO, Isabel ; FAN, Yuhong ; SORIA, Rebeca ; MARTINEZ-PASTOR, Barbara ; CUADRADO, Myriam ; YANG, Seung-Min ; BLASCO, Maria A. ; SKOULTCHI, Arthur I. ; FERNANDEZ-CAPETILLO, Oscar: Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. In: *J Cell Biol* 178 (2007), Sep, Nr. 7, 1101–1108. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200704140>
- [193] FALK, Martin ; LUKÁŠOVÁ, Emilie ; STEFANČÍKOVÁ, Lenka ; BARANOVÁ, Elena ; FALKOVÁ, Iva ; JEŽKOVÁ, Lucie ; DAVIDKOVÁ, Marie ; BAČÍKOVÁ, Alena ; VACHELOVÁ, Jana ; MICHAELIDESOVÁ, Anna ; KOZUBEK, Stanislav: Heterochromatinization associated with cell differentiation as a model to study DNA double strand break induction and repair in the context of higher-order chromatin structure. In: *Appl Radiat Isot* 83 Pt B (2014), Jan, 177–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2013.01.029>
- [194] NATARAJAN, A. T. ; AHNSTRÖM, G.: Heterochromatin and chromosome aberrations. In: *Chromosoma* 28 (1969), Nr. 1, S. 48–61
- [195] ELIA, M. C. ; BRADLEY, M. O.: Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation. In: *Cancer Res* 52 (1992), Mar, Nr. 6, S. 1580–1586
- [196] STENERLOEW, B. ; HOGLUND, E. ; CARLSSON, J.: DNA fragmentation by charged particle tracks. In: *Advances in Space Research* 30 (2002), Nr. 4, S. 859–863
- [197] FALK, Martin ; LUKÁŠOVÁ, Emilie ; KOZUBEK, Stanislav: Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. In: *Biochim Biophys Acta* 1783 (2008), Dec, Nr. 12, 2398–2414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.010>
- [198] COWELL, Ian G. ; SUNTER, Nicola J. ; SINGH, Prim B. ; AUSTIN, Caroline A. ; DURKACZ, Barbara W. ; TILBY, Michael J.: gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. In: *PLoS One* 2 (2007), Nr. 10, e1057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001057>
- [199] FALK, Martin ; LUKASOVA, Emilie ; GABRIELOVA, Barbora ; ONDREJ, Vladan ; KOZUBEK, Stanislav: Chromatin dynamics during DSB repair. In: *Biochim Biophys Acta* 1773 (2007), Oct, Nr. 10, 1534–1545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.07.002>
- [200] COSTES, S. V. ; CHILOLO, I. ; PLUTH, J. M. ; BARCELLOS-HOFF, M. H. ; JAKOB, B.: Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. In: *Mutat Res* 704 (2010), Nr. 1-3, 78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.006>
- [201] JAKOB, Burkhard ; SPLINTER, Jörn ; CONRAD, Sandro ; VOSS, Kay-Obbe ; ZINK, Daniele ; DURANTE, Marco ; LÖBRICH, Markus ; TAUCHER-SCHOLZ, Gisela: DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. In: *Nucleic Acids Res* 39 (2011), Aug, Nr. 15, 6489–6499. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr230>
- [202] COSTES, Sylvain V. ; BOISSIÈRE, Arnaud ; RAVANI, Shradha ; ROMANO, Raquel ; PARVIN, Bahram ; BARCELLOS-HOFF, Mary H.: Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. In: *Radiat Res* 165 (2006), May, Nr. 5, 505–515. <http://dx.doi.org/10.1667/RR3538.1>
- [203] SEKINE, Emiko ; OKADA, Maki ; MATSUFUJI, Naruhiro ; YU, Dong ; FURUSAWA, Yoshiya ; OKAYASU, Ryuichi: High LET heavy ion radiation induces lower numbers of initial chromosome breaks with minimal repair than low LET radiation in normal human cells. In: *Mutat Res* 652 (2008), Mar, Nr. 1, 95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.01.003>

- [204] JOHNSON, R. T. ; RAO, P. N.: Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. In: *Nature* 226 (1970), May, Nr. 5247, S. 717–722
- [205] FRANCISCO, Dave C. ; PEDDI, Prakash ; HAIR, Jessica M. ; FLOOD, Brittany A. ; CECIL, Angela M. ; KALOGERINIS, Peter T. ; SIGOUNAS, George ; GEORGAKILAS, Alexandros G.: Induction and processing of complex DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 and nonmalignant MCF-10A cells. In: *Free Radic Biol Med* 44 (2008), Feb, Nr. 4, 558–569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.045>
- [206] OLIVE, P. L. ; DURAND, R. E.: Detection of hypoxic cells in a murine tumor with the use of the comet assay. In: *J Natl Cancer Inst* 84 (1992), May, Nr. 9, S. 707–711
- [207] PONOMAREV, Artem L. ; COSTES, Sylvain V. ; CUCINOTTA, Francis A.: Stochastic properties of radiation-induced DSB: DSB distributions in large scale chromatin loops, the HPRT gene and within the visible volumes of DNA repair foci. In: *Int J Radiat Biol* 84 (2008), Nov, Nr. 11, 916–929. <http://dx.doi.org/10.1080/09553000802499212>
- [208] BÖCKER, Wilfried ; ILIAKIS, George: Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. In: *Radiat Res* 165 (2006), Jan, Nr. 1, S. 113–124
- [209] LÖBRICH, M. ; COOPER, P. K. ; RYDBERG, B.: Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. In: *Int J Radiat Biol* 70 (1996), Nov, Nr. 5, S. 493–503
- [210] COSTES, Sylvain V. ; PONOMAREV, Artem ; CHEN, James L. ; NGUYEN, David ; CUCINOTTA, Francis A. ; BARCELLOS-HOFF, Mary H.: Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. In: *PLoS Comput Biol* 3 (2007), Aug, Nr. 8, e155. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030155>
- [211] NEUMAIER, Teresa ; SWENSON, Joel ; PHAM, Christopher ; POLYZOS, Aris ; LO, Alvin T. ; YANG, PoAn ; DYBALL, Jane ; ASAITHAMBY, Aroumougame ; CHEN, David J. ; BISSELL, Mina J. ; THALHAMMER, Stefan ; COSTES, Sylvain V.: Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (2012), Jan, Nr. 2, 443–448. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117849108>
- [212] FALK, Martin ; LUKASOVA, Emilie ; KOZUBEK, Stanislav: Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. In: *Mutat Res* 704 (2010), Nr. 1-3, 88–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.013>
- [213] JAKOB, B. ; SCHOLZ, M. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Biological imaging of heavy charged-particle tracks. In: *Radiat Res* 159 (2003), May, Nr. 5, S. 676–684
- [214] JAKOB, B. ; SPLINTER, J. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. In: *Radiat Res* 171 (2009), Apr, Nr. 4, 405–418. <http://dx.doi.org/10.1667/RR1520.1>
- [215] GIRST, S. ; HABLE, V. ; DREXLER, G. A. ; GREUBEL, C. ; SIEBENWIRTH, C. ; HAUM, M. ; FRIEDL, A. A. ; DOLLINGER, G.: Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks. In: *Sci Rep* 3 (2013), 2511. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02511>
- [216] LANCTOT, Christian ; CHEUTIN, Thierry ; CREMER, Marion ; CAVALLI, Giacomo ; CREMER, Thomas: Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. In: *Nat Rev Genet* 8 (2007), Februar, Nr. 2, 104–115. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2041>. – ISSN 1471–0056
- [217] CREMER, Thomas ; CREMER, Marion: Chromosome territories. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (2010), Mar, Nr. 3, a003889. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
- [218] CADDLE, Lura B. ; GRANT, Jeremy L. ; SZATKIEWICZ, Jin ; HASE, Johann van ; SHIRLEY, Bobbi-Jo ; BEWERSDORF, Joerg ; CREMER, Christoph ; ARNEODO, Alain ; KHALIL, Andre ; MILLS, Kevin D.: Chromosome neighborhood composition determines translocation outcomes after exposure to high-dose radiation in primary cells. In: *Chromosome Res* 15 (2007), Nr. 8, 1061–1073. <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-007-1181-7>
- [219] FERAUDY, Sebastien de ; REVET, Ingrid ; BEZROOKOVE, Vladimir ; FEENEY, Luzviminda ; CLEAVER, James E.: A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (2010), Apr, Nr. 15, 6870–6875. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002175107>
- [220] MEYER, Barbara ; VOSS, Kay-Obbe ; TOBIAS, Frank ; JAKOB, Burkhard ; DURANTE, Marco ; TAUCHER-SCHOLZ, Giselaspatiotemporal: Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. In: *Nucleic Acids Res* 41 (2013), Jul, Nr. 12, 6109–6118. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt304>

- [221] QUANZ, Maria ; CHASSOUX, Danielle ; BERTHAULT, Nathalie ; AGRARIO, Céline ; SUN, Jian-Sheng ; DUTREIX, Marie: Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 7, e6298. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006298>
- [222] NAKADA, Shinichiro ; CHEN, Ginny I. ; GINGRAS, Anne-Claude ; DUROCHER, Daniel: PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. In: *EMBO Rep* 9 (2008), Oct, Nr. 10, 1019–1026. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2008.162>
- [223] OLIVE, Peggy L. ; BANÁTH, Judit P.: Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (2004), Feb, Nr. 2, S. 331–335
- [224] ROTHKAMM, Kai ; KRÜGER, Ines ; THOMPSON, Larry H. ; LÖBRICH, Markus: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), Aug, Nr. 16, S. 5706–5715
- [225] GOODARZI, Aaron A. ; JEGGO, Penny ; LOBRICH, Markus: The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. In: *DNA Repair (Amst)* 9 (2010), Dec, Nr. 12, 1273–1282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.013>
- [226] ASAITHAMBY, Aroumougame ; UEMATSU, Naoya ; CHATTERJEE, Alope ; STORY, Michael D. ; BURMA, Sandeep ; CHEN, David J.: Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. In: *Radiat Res* 169 (2008), Apr, Nr. 4, 437–446. <http://dx.doi.org/10.1667/RR1165.1>
- [227] ZAFAR, Faria ; SEIDLER, Sara B. ; KRONENBERG, Amy ; SCHILD, David ; WIESE, Claudia: Homologous recombination contributes to the repair of DNA double-strand breaks induced by high-energy iron ions. In: *Radiat Res* 173 (2010), Jan, Nr. 1, 27–39. <http://dx.doi.org/10.1667/RR1910.1>
- [228] YAJIMA, Hirohiko ; FUJISAWA, Hiroshi ; NAKAJIMA, Nakako I. ; HIRAKAWA, Hirokazu ; JEGGO, Penelope A. ; OKAYASU, Ryuichi ; FUJIMORI, Akira: The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. In: *DNA Repair (Amst)* 12 (2013), Nov, Nr. 11, 936–946. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.08.009>
- [229] SAHA, Janapriya ; WANG, Minli ; CUCINOTTA, Francis A.: Investigation of switch from ATM to ATR signaling at the sites of DNA damage induced by low and high LET radiation. In: *DNA Repair (Amst)* 12 (2013), Dec, Nr. 12, 1143–1151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.10.004>
- [230] SAHA, Janapriya ; WILSON, Paul ; THIEBERGER, Peter ; LOWENSTEIN, Derek ; WANG, Minli ; CUCINOTTA, Francis A.: Biological characterization of low-energy ions with high-energy deposition on human cells. In: *Radiat Res* 182 (2014), Sep, Nr. 3, 282–291. <http://dx.doi.org/10.1667/RR13747.1>
- [231] PEDDI, Prakash ; FRANCISCO, Dave C. ; CECIL, Angela M. ; HAIR, Jessica M. ; PANAYIOTIDIS, Mihalios I. ; GEORGAKILAS, Alexandros G.: Processing of clustered DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 with partial DNA-PKcs deficiency. In: *Cancer Lett* 269 (2008), Sep, Nr. 1, 174–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.049>
- [232] WANG, Hongyan ; WANG, Xiang ; ZHANG, Piyan ; WANG, Ya: The Ku-dependent non-homologous end-joining but not other repair pathway is inhibited by high linear energy transfer ionizing radiation. In: *DNA Repair (Amst)* 7 (2008), May, Nr. 5, 725–733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.01.010>
- [233] LEE, J.-J. ; KIM, B. C. ; PARK, M.-J. ; LEE, Y.-S. ; KIM, Y.-N. ; LEE, B. L. ; LEE, J.-S.: PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. In: *Cell Death Differ* 18 (2011), Apr, Nr. 4, 666–677. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.139>
- [234] LÉONCE, Stéphane ; KRAUS-BERTHIER, Laurence ; GOLSTEYN, Roy M. ; DAVID-CORDONNIER, Marie-Hélène ; TARDY, Christelle ; LANSIAUX, Amélie ; POINDESSOUS, Virginie ; LARSEN, Annette K. ; PIERRÉ, Alain: Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1. In: *Cancer Res* 66 (2006), Jul, Nr. 14, 7203–7210. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3946>
- [235] HARPER, Jane V. ; ANDERSON, Jennifer A. ; O'NEILL, Peter: Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? In: *DNA Repair (Amst)* 9 (2010), Aug, Nr. 8, 907–913. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.06.002>
- [236] GROTH, Petra ; ORTA, Manuel L. ; ELVERS, Ingegerd ; MAJUMDER, Muntasir M. ; LAGERQVIST, Anne ; HELLEDAY, Thomas: Homologous recombination repairs secondary replication induced DNA double-strand breaks after ionizing radiation. In: *Nucleic Acids Res* 40 (2012), Aug, Nr. 14, 6585–6594. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks315>
- [237] LOMAX, M. E. ; FOLKES, L. K. ; O'NEILL, P.: Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. In: *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 25 (2013), Oct, Nr. 10, 578–585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>

- [238] ELKIND, M.M. ; REDPATH, J.L.: *Molecular and cellular biology of radiation lethality*. United States : Plenum Publishing Corp, 1977. – – S.
- [239] OHTA, Tomohiko ; SATO, Ko ; WU, Wenwen: The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. In: *FEBS Letters* 585 (2011), Nr. 18, 2836 - 2844. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579311003450>. – ISSN 0014-5793. – <ce:title>Ubiquitin Family Proteins in DNA Damage Response</ce:title>
- [240] CAESTECKER, Kevin W. ; WALLE, Gerlinde R. V.: The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: Past and present. In: *Experimental Cell Research* 319 (2013), Nr. 5, 575 - 587. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482712004685>. – ISSN 0014-4827
- [241] DEEM, Angela ; KESZTHELYI, Andrea ; BLACKGROVE, Tiffany ; VAYL, Alexandra ; COFFEY, Barbara ; MATHUR, Ruchi ; CHABES, Andrei ; MALKOVA, Anna: Break-induced replication is highly inaccurate. In: *PLoS Biol* 9 (2011), Nr. 2, e1000594. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000594>
- [242] SAKOFSKY, Cynthia J. ; AYYAR, Sandeep ; MALKOVA, Anna: Break-Induced Replication and Genome Stability. In: *Biomolecules* 2 (2012), Dec, Nr. 4, 483–504. <http://dx.doi.org/10.3390/biom2040483>
- [243] NAKAJIMA, Nakako I. ; BRUNTON, Holly ; WATANABE, Ritsuko ; SHRIKHANDE, Amruta ; HIRAYAMA, Ryoichi ; MATSUFUJI, Naruhiro ; FUJIMORI, Akira ; MURAKAMI, Takeshi ; OKAYASU, Ryuichi ; JEGGO, Penny ; SHIBATA, Atsushi: Visualisation of γ H2AX foci caused by heavy ion particle traversal; distinction between core track versus non-track damage. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 8, e70107. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070107>
- [244] ICHIJIMA, Yosuke ; SAKASAI, Ryo ; OKITA, Naoyuki ; ASAHINA, Kinji ; MIZUTANI, Shuki ; TERAOKA, Hirobumi: Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. In: *Biochem Biophys Res Commun* 336 (2005), Oct, Nr. 3, 807–812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.164>
- [245] SZILARD, Rachel K. ; JACQUES, Pierre-Etienne ; LARAMÉE, Louise ; CHENG, Benjamin ; GALICIA, Sarah ; BATAILLE, Alain R. ; YEUNG, ManTek ; MENDEZ, Megan ; BERGERON, Maxime ; ROBERT, François ; DUROCHER, Daniel: Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (2010), Mar, Nr. 3, 299–305. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1754>
- [246] BEWERSDORF, Jörg ; BENNETT, Brian T. ; KNIGHT, Kendall L.: H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006), Nov, Nr. 48, 18137–18142. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608709103>
- [247] KIEFER, J. ; STRAATEN, H.: A model of ion track structure based on classical collision dynamics. In: *Phys Med Biol* 31 (1986), Nov, Nr. 11, S. 1201–1209
- [248] RIGAKOS, Georgios ; RAZIS, Evangelia: BRCAness: finding the Achilles heel in ovarian cancer. In: *Oncologist* 17 (2012), Nr. 7, 956–962. <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0028>
- [249] DESPRAS, Emmanuelle ; PFEIFFER, Petra ; SALLES, Bernard ; CALSOU, Patrick ; KUHFITIG-KULLE, Steffi ; ANGULO, Jaime F. ; BIARD, Denis S F.: Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. In: *Cancer Res* 67 (2007), Mar, Nr. 6, 2526–2534. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3371>
- [250] TOULANY, Mahmoud ; LEE, Kyung-Jong ; FATTAH, Kazi R. ; LIN, Yu-Fen ; FEHRENBACHER, Brigit ; SCHALLER, Martin ; CHEN, Benjamin P. ; CHEN, David J. ; RODEMANN, H P.: Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. In: *Mol Cancer Res* 10 (2012), Jul, Nr. 7, 945–957. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0592>
- [251] XU, Naihan ; LAO, Yuanzhi ; ZHANG, Yaou ; GILLESPIE, David A.: Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. In: *J Oncol* 2012 (2012), 951724. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/951724>
- [252] MCELLIN, Brian ; CAMACHO, Cristel V. ; MUKHERJEE, Bipasha ; HAHM, Brandon ; TOMIMATSU, Nozomi ; BACHOO, Robert M. ; BURMA, Sandeepdittmann: PTEN loss compromises homologous recombination repair in astrocytes: implications for glioblastoma therapy with temozolomide or poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. In: *Cancer Res* 70 (2010), Jul, Nr. 13, 5457–5464. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4295>
- [253] COMBS, Stephanie E. ; BRUCKNER, Thomas ; MIZOE, Jun-Etso ; KAMADA, Tadashi ; TSUJII, Hirohiko ; KIESER, Meinhard ; DEBUS, Jürgen: Comparison of carbon ion radiotherapy to photon radiation alone or in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: explorative hypothesis-generating retrospective analysis. In: *Radiother Oncol* 108 (2013), Jul, Nr. 1, 132–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.026>

- [254] COMBS, Stephanie E. ; KIESER, Meinhard ; RIEKEN, Stefan ; HABERMEHL, Daniel ; JÄKEL, Oliver ; HABERER, Thomas ; NIKOGHOSYAN, Anna ; HASELMANN, Renate ; UNTERBERG, Andreas ; WICK, Wolfgang ; DEBUS, Jürgen: Randomized phase II study evaluating a carbon ion boost applied after combined radiochemotherapy with temozolomide versus a proton boost after radiochemotherapy with temozolomide in patients with primary glioblastoma: the CLEOPATRA trial. In: *BMC Cancer* 10 (2010), 478. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-478>
- [255] TAKAHASHI, Akihisa ; KUBO, Makoto ; MA, Hongyu ; NAKAGAWA, Akiko ; YOSHIDA, Yukari ; ISONO, Mayu ; KANAI, Tatsuaki ; OHNO, Tatsuya ; FURUSAWA, Yoshiya ; FUNAYAMA, Tomoo ; KOBAYASHI, Yasuhiko ; NAKANO, Takashi: Nonhomologous end-joining repair plays a more important role than homologous recombination repair in defining radiosensitivity after exposure to high-LET radiation. In: *Radiat Res* 182 (2014), Sep, Nr. 3, 338–344. <http://dx.doi.org/10.1667/RR13782.1>
- [256] WU, Wenqi ; WANG, Minli ; WU, Weizhong ; SINGH, Satyendra K. ; MUSSFELDT, Tamara ; ILIAKIS, George: Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. In: *DNA Repair (Amst)* 7 (2008), Feb, Nr. 2, 329–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.11.008>
- [257] WANG, Hongyan ; ZHANG, Xiangming ; WANG, Ping ; YU, Xiaoyan ; ESSERS, Jeroen ; CHEN, David ; KANAAR, Roland ; TAKEDA, Shunichi ; WANG, Ya: Characteristics of DNA-binding proteins determine the biological sensitivity to high-linear energy transfer radiation. In: *Nucleic Acids Res* 38 (2010), Jun, Nr. 10, 3245–3251. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq069>