

Sensitivität humaner Immunzellen gegenüber ionisierender Strahlung und anderen genotoxischen Noxen

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Daniel Heylmann
geboren am 15.10.1985 in Kirn

Mainz, März 2017

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2017

D77 (Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

„Man kann nicht hoffen, die Welt zum Besseren zu wenden, wenn sich der Einzelne nicht zum Besseren wendet. Dazu sollte jeder von uns an seiner eigenen Vervollkommnung arbeiten und sich dessen bewußt werden, daß er die persönliche Verantwortung für alles trägt, was in dieser Welt geschieht, und daß es die direkte Pflicht eines jeden ist, sich dort nützlich zu machen, wo er sich am nützlichsten machen kann.“

Marie Curie (1867 - 1934), polnisch-französische Physikerin und Chemikerin
1903 Nobelpreis für Physik, 1911 für Chemie

Zusammenfassung

Der Mensch ist stets radioaktiver Strahlung ausgesetzt: täglich durch die natürliche Hintergrundstrahlung, bei Reisen mit dem Flugzeug, in radioaktiv verseuchten Gebieten nach nuklearen Unfällen sowie in medizinischer Diagnostik und Therapie. Die Zellen im menschlichen Körper reagieren nicht in gleicher Weise auf ionisierende Strahlung (IR). Insbesondere Blutzellen sind sehr strahlensensitiv. Dies führt während der Strahlentherapie zur Immunsuppression.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Strahlensensitivität der verschiedenen Blutzellpopulationen vergleichend zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass lymphoide Blutzellen wie T-, B- und NK-Zellen sowie CD34-positive Vorläuferzellen signifikant strahlensensitiver sind als Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die Hauptursache der Toxizität von ionisierender Strahlung, wurden in den untersuchten Blutzellen jedoch effizient repariert. Dies äußerte sich in der zeitlichen Abnahme von γ H2AX, ein Marker für DSB. Eine Ausnahme bildeten Granulozyten, die nach γ -Strahlung keine γ H2AX-Foci ausbildeten und keinen strahleninduzierten Zelltod untergingen. T-Zellen von Patienten, die einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt waren, zeigten signifikant mehr persistierende γ H2AX-Foci als Monozyten.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um DNA-Schäden in Zellen aus nur einem aus der Fingerkuppe mikro-invasiv entnommenen Tropfen Blut zu analysieren. Diese Blutropfenmethode (*blood drop method*, BDM) ermöglicht schnelle Analysen von DNA-Schäden in Ko-Färbung mit Oberflächenmarkern von T-Zellen und Monozyten, individuelle Bestimmungen von DNA-Reparaturkinetiken, ein Anfärben weiterer diagnostischer Proteinmarker sowie eine Adaption auf Mausexperimente. Die BDM stellt einen wichtigen Schritt dar, um epidemiologische Feldstudien, bio-dosimetrische Bestimmungen und die Überwachung von Patienten in der personalisierten Krebstherapie hinsichtlich Analysen von DNA-Schäden in Blutzellen einfach und effizient durchführen zu können.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Strahlensensitivität von unstimulierten und CD3-/CD28-stimulierten T-Zellen (Lymphozyten) verglichen. Eine Aktivierung von CD3- und CD28-Rezeptoren, wie sie bei Immunreaktionen und in der Immuntherapie auftritt, führte in den Zellen zu einer Strahlenresistenz. Es wurde aber auch eine erhöhte Caspaseaktivität, PARP-1-Spaltung und eine Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet. Unstimulierte Lymphozyten starben nach Bestrahlung einen Caspase-unabhängigen Zelltod. In der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden sowie in der Induktion und Phosphorylierung von p53 konnten keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten festgestellt werden.

Die DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) ist jedoch erheblich in der Einleitung des Zelltodes in Lymphozyten nach Bestrahlung beteiligt. So zeigte sich durch eine Hemmung von Faktoren der DDR wie des MRN-Komplexes, ATM, CHK1 und CHK2 ein Schutz von Lymphozyten gegenüber IR. Die strahlenresistenteren stimulierten Lymphozyten zeigten nach IR eine geringere Aktivierung von ATM als auch eine transkriptionelle Herabregulation von ATM im Vergleich zu ihrem unstimulierten Gegenpart. Inhibitoren von ATR, PARP-1, p53, RIPK1, Survivin und MTH1 zeigten keinen Einfluss auf den IR-induzierten Zelltod in Lymphozyten. Eine Hemmung des Enzyms MTH1 war zudem toxisch in stimulierten Lymphozyten. Im Gegensatz zur IR zeigten stimulierte Lymphozyten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber dem bakteriellen Toxin und Radiomimetikum CDT sowie dem methylierenden Chemotherapeutikum Temozolomid. Unstimulierte Lymphozyten hingegen waren besonders sensitiv gegenüber dem DNA-Crosslinker und Chemotherapeutikum Mafosfamid. Geringe Dosen Mafosfamid zeigten eine selektive Toxizität gegenüber immunhemmenden regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen.

Die hier dargestellten Untersuchungen zur DNA-Reparatur und Toxizität von Blutzellen nach gentoxischen Noxen dienen u.a. zur Optimierung immuntherapeutischer Strategien insbesondere in Kombination mit Strahlentherapie, konventioneller Chemotherapie und pharmakologischer Inhibitoren.

Abstract

Humans are exposed to ionizing radiation (IR) in various settings: daily through natural background radiation, in radioactively contaminated areas after nuclear accidents or in therapeutic interventions. Human cells do not respond equally to IR. Especially blood cells are highly radiosensitive, which results in immunosuppression during radiotherapy. In this work, the sensitivity of different blood cell populations towards IR was studied in a comparative manner.

It was shown that lymphoid cells like T cells, B cells, NK cells as well as CD34+ progenitor cells are significantly more radiosensitive as blood cells from the myeloid lineage such as monocytes, macrophages and dendritic cells. DNA double-strand breaks, the main toxic lesion of IR, were repaired efficiently in all analyzed blood cells. This was visualized by a decrease of IR-induced γ H2AX foci by time. Granulocytes showed no induction of γ H2AX foci as well as no IR-induced cell death. Interestingly, T cells in patients receiving whole-body irradiation showed more persisting γ H2AX foci as monocytes.

Furthermore, we established a method to analyze DNA damage in cells obtained micro-invasively from only one drop of blood from the fingertip. The blood drop method (BDM) allows a simple and fast analysis of DNA damage with co-staining of surface markers from T cells or monocytes, individual screening of DNA repair kinetics and is also applicable for staining of other DNA damage response (DDR) markers as well as for mouse experiments. The BDM represents an important step towards epidemiological field studies, biodosimetric analysis and monitoring of patients in personalized anticancer therapy.

On top of that, we compared the radiosensitivity of unstimulated and CD3-/CD28-stimulated T lymphocytes. Activation of these receptors, as it happens in immune responses or following immunotherapy, resulted in radioprotection, but also induced reactive oxygen species, caspase activation and PARP-1 fragmentation. Unstimulated lymphocytes underwent a caspase-independent, AnnexinV-positive cell death. Both, unstimulated and stimulated lymphocytes, repaired IR-induced DNA damage efficiently and showed no differences in induction and phosphorylation of p53.

The DNA damage response is considerably involved in triggering cell death in lymphocytes. Thus, inhibition of DDR factors as the MRN complex, ATM, CHK1 and CHK2 conferred protection towards IR in unstimulated lymphocytes. Radioresistant stimulated lymphocytes showed less activation of ATM after IR and transcriptional downregulation of ATM compared to their unstimulated counterpart. Radioprotection of lymphocytes was not obvious after inhibition of ATR, PARP-1, p53, RIPK1, Survivin and MTH1. Moreover, inhibition of MTH1 was toxic in stimulated but not unstimulated cells.

In contrast to IR, stimulated lymphocytes showed increased toxicity towards the bacterial toxin CDT, a radiomimetic agent with DNase I-like endonuclease activity, as well as to the methylating anticancer drug temozolomide. However, unstimulated lymphocytes were highly sensitive towards the DNA-crosslinker and chemotherapeutic agent mafosfamide. Especially low doses of mafosfamide showed selective toxicity to immune inhibitory and tumor-protective regulatory T cells compared to cytotoxic T cells and T helper cells.

The findings herein are important for optimizing passive and active immunotherapeutic strategies especially in combination with radiotherapy, conventional chemotherapy and pharmacological inhibitors and for evaluating immunodeficiency and the implication for the immune response.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	4
1.1.2 Das adaptive (erworbene) Immunsystem	7
1.1.3 Das Immunsystem in der Tumorumgebung.....	10
1.1.4 Immuntherapie und therapeutische Modulation des Immunsystems.....	11
1.2 Ionisierende Strahlung	13
1.2.1 Definition und Klassifikation der IR und Fallbeispiele zur Exposition	14
1.2.2 Biologische, zelluläre Effekte von IR	17
1.2.3 Die DNA-Schadenserkennung: MRN-ATM-ATR-DNAPK - Abb. 1.4 A.....	19
1.2.4 γH2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche	20
1.2.5 Reparatur der DSB durch die Nicht-homologe End-zu-Endverknüpfung (NHEJ) - Abb. 1.4 B	22
1.2.6 Reparatur der DSB durch die Homologe Rekombination (HR) - Abb. 1.4 C	23
1.2.7 Reparatur der Basenmodifikationen durch die Basenexzisionsreparatur (BER) - Abb. 1.4 D	25
1.3 Zelltodwege nach DNA-Schaden	26
1.3.1 Apoptose.....	27
1.3.2 Nekrose.....	28
1.3.3 Autophagie.....	28
1.3.4 Seneszenz	29
1.3.5 Nekroptose	29
1.3.6 Parthanatos	30
1.3.7 Pyroptose.....	30
1.4 Weitere genotoxische Noxen	30
1.4.1 Cytolethal distending Toxin (CDT).....	30
1.4.2 Temozolomid (TMZ).....	31
1.4.3 Mafosfamid, ein Derivat des Cyclophosphamids	33
1.5 Zielsetzung.....	35
2 Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Zellmaterial	37
2.1.2 Kits	37
2.1.3 Antikörper.....	38

2.1.4	Zellkulturmaterial.....	40
2.1.5	Zytokine	41
2.1.6	Chemikalien	41
2.1.7	Zytostatika/Gentoxine	42
2.1.8	Inhibitoren	43
2.1.9	Geräte	43
2.1.10	Puffer und Lösungen	45
2.1.11	Software.....	47
2.2	Methoden	48
2.2.1	Isolation peripherer Blutzellen aus <i>Buffy Coat</i>	48
2.2.2	Isolation peripherer Blutzellen (PBMCs und Granulozyten) aus Vollblut.....	49
2.2.3	Aufreinigung von PBLs und Monozyten über Adhärenzschritte	49
2.2.4	Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Dendritischen Zellen	50
2.2.5	Aufreinigung von Zellen aus PBMCs mit magnetischen <i>Beads</i> und Phänotypisierung am Durchflusszytometer.....	50
2.2.6	Übersicht der verwendeten Blutzelltypen	52
2.2.7	Kultivieren der Zellen	54
2.2.8	Stimulation von PBLs bzw. T-Zellen	54
2.2.9	Stimulation CD34+ Vorläuferzellen und CFU-Assay	54
2.2.10	Exposition der Zellen mit ionisierender Strahlung	55
2.2.11	Behandlung der Zellen mit Inhibitoren und gentoxischen Agenzien.....	55
2.2.12	Mausexperimente für die BDM	55
2.2.13	Messung des Zelltodes am Durchflusszytometer mit AnnexinV/PI	56
2.2.14	Bestimmung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer	57
2.2.15	Messung von intrazellulärem ROS am Durchflusszytometer	57
2.2.16	Messung der Autophagie am Durchflusszytometer	58
2.2.17	Messung der Seneszenz am Durchflusszytometer	58
2.2.18	Vorbehandlung der Deckgläser für die Immunfärbung	58
2.2.19	Probenauftragung für die γ H2AX-Immunfärbung	59
2.2.20	Immunfärbung von γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche	59
2.2.21	<i>Imaging</i> und Auswertung der Immunfärbungen.....	60
2.2.22	AIF- und PAR-Färbung für die Auswertung am LSM.....	60
2.2.23	Neutrale Einzelzellgelelektrophorese (Neutraler <i>Comet Assay</i>).....	61
2.2.24	Alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Alkalischer <i>Comet Assay</i>).....	61
2.2.25	Herstellung von Gesamtzellextrakten für Proteinanalysen	62
2.2.26	Bestimmung der Proteinmenge mit der Bradford-Methode	62
2.2.27	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.2.28	Western Blot Transfer und Ponceau S-Färbung.....	63

2.2.29	Analyse von Proteinen am Odyssey®-Infrared-Imaging-System	63
2.2.30	Caspase-3/7 Aktivitäts-Assay	64
2.2.31	RNA-Isolation für <i>Real-Time</i> RT-PCR	64
2.2.32	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase	64
2.2.33	Semiquantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR	65
3	Ergebnisse	67
3.1	Induktion des Zelltodes von peripheren humanen Blutzellen nach verschiedenen Dosen ionisierender Strahlung	67
3.2	Strahlensensitivität von regulatorischen T-Zellen, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen.....	70
3.3	Strahleninduzierte γ H2AX-Foci als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche in verschiedenen Blutzellpopulationen	71
3.4	Vergleich T-Zelle versus Monozyt.....	76
3.5	γ H2AX in T-Zellen und Monozyten von Leukämiepatienten im Zeitraum einer Ganzkörperbestrahlung	77
3.6	Die Etablierung der Blutropfenmethode zur Analyse von DNA-Schäden	83
3.7	Auswirkung der Stimulation des CD3 T-Zellrezeptors und CD28 Ko-Rezeptors auf die Morphologie von T-Zellen	90
3.8	Strahlensensitivität unstimulierter vs. stimulierter Lymphozyten.....	92
3.9	Untersuchung der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und -Einzelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten	96
3.10	Expression und Induktion von p53 und des FasR nach IR	98
3.11	Caspase-Aktivität und Effekt der Caspase-Inhibition in Lymphozyten	101
3.12	Einfluss einer Inhibition von PARP auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten	105
3.13	Einfluss der Inhibition von ATM, ATR, p53 und RIP1 auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten.....	108
3.14	Einfluss der Inhibition von CHK1 und CHK2 auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten	110
3.15	Einfluss der Inhibition des MRN-Komplexes (MRE11) und DNA-PK auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten	111
3.16	Einfluss der Vorbehandlung mit Dasatinib auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten	112
3.17	Immunhistochemische Färbung von phospho-ATM in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten	113
3.18	Analyse der Genexpression mittels <i>Real-Time</i> RT-PCR: Vergleich von CD3/CD28 aktivierten vs. nicht-aktivierten Lymphozyten	115
3.19	Einfluss der Inhibition von Survivin auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten	118
3.20	Induktion von ROS und der Effekt der MTH1-Inhibition auf Lymphozyten.....	119
3.21	Toxizität des Radiomimetikums CDT auf Lymphozyten	122
3.22	Zelltodinduktion in Lymphozyten durch Temozolomid	123

3.23	Zelltodinduktion in Lymphozyten durch Mafosfamid	126
3.24	Zelltodinduktion in Treg, Th und CTL durch Nimustin und Mitomycin C	128
4	Diskussion	129
4.1	Lymphoide Immunzellen sowie CD34+ Vorläuferzellen sind sensitiver gegenüber ionisierender Strahlung als myeloide Immunzellen	129
4.2	γ H2AX als Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur in Leukozyten	135
4.3	Die Blutropfenmethode (<i>Blood Drop Method</i> , BDM) – ein mikro-invasiver γ H2AX DNA-Schadensassay	139
4.4	Unstimulierte Lymphozyten sind strahlensensitiv und eine Stimulation des T-Zellrezeptors mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 führt zur Strahlenresistenz	143
4.5	Sensitivität von Lymphozyten gegenüber CDT und TMZ	151
4.6	Sensitivität von Lymphozyten, insbesondere von Treg, gegenüber Mafosfamid und die daraus resultierende Implikation für die Immunantwort	153
4.7	Überblick und mögliche translationale Umsetzung in der Kombinationstherapie bei Krebs	155
5	Referenzen	160
6	Anhang	184
	Publikationsverzeichnis/Kongressteilnahmen	194
	Danksagung	196
	Erklärung	197
	Lebenslauf	198

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ
°C	Grad Celsius
+	positiv
53BP1	<i>p53-binding protein</i>
Abb.	Abbildung
AK/mAK/pAK	Antikörper/monoklonaler AK/polyklonaler AK
APC	Allophycocyanin
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BDM	Blutropfenmethode
BER	Basenexzisionsreparatur
BFU	<i>Burst-Forming Units</i>
bright	stark
Casp	Caspase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDT	<i>Cytotoxic distending toxin</i>
CDTm	<i>Cytotoxic distending toxin mutated</i>
CFU-GEMM	<i>Colony-Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte</i>
CFU-S	<i>Colony-Forming Unit-Spleen</i>
CHK	<i>Checkpoint Kinase</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte/Zytotoxische T-Zelle</i>
d.h.	das heißt
DCs	<i>Dendritic cells/Dendritische Zellen</i>
dd	<i>double distilled</i>
DDR	<i>DNA damage response/DNA-Schadensantwort</i>
dim	schwach
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
DSB	DNA double-strand break/DNA-Doppelstrangbruch
e-	Elektron
EPO	Erythropoetin
et al.	und andere
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting/Durchflusszytometer</i>
FasR	Fas-Rezeptor
FITC	Fluorescein
FSC	<i>Forward Scatter</i>
γ	gamma
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>

Gy	Gray
h	<i>hour</i> /Stunde
H2AX	Histon 2AX
HR	Homologe Rekombination
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
i	Inhibitor
ICL	DNA-Interstrang-Crosslink
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IR	<i>Ionizing Radiation</i> /Ionisierende Strahlung
IU	<i>International Unit</i> /Internationale Einheit
K	Kontrolle
l	Liter
Ig	Immunglobulin (Antikörper)
Lin	<i>Lineage</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i> /konfokales Mikroskop
M	Molar
m	Meter
μ	micro
M-CSF	<i>Macrophage-Stimulating Factor</i>
mA	Milliampere
MAF	Mafosfamid
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> /Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
Mo	Monozyt
Mph	Makrophage
MRA	<i>Bone Marrow-Repopulating Ability</i>
MRE11	<i>Meiotic Recombination 11</i>
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
MTH1	MutT Homolog 1
n	nano
n = X	X-unabhängige Experimente/ <i>Buffy Coats</i>
NHEJ	Nicht-homologe End-zu-Endverknüpfung
NK	Natürliche Killerzelle
o.g.	oben genannte
O6BG	O ⁶ -Benzylguanin
OD	Optische Dichte
OTM	<i>Olive Tail Moment</i>
P	Patient
p	phospho
*p	Signifikanzwert
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBLs	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> /Periphere Blutlymphozyten

PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> /Periphere mononukleäre Blutzellen
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
Pol	Polymerase
RIP1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> /reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>Replication Protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	stimuliert
sek	Sekunden
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> /Standardfehler
Ser	Serin
sog.	sogenannte
SSB	<i>DNA single-strand break</i> /DNA-Einzelstrangbruch
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
Suri	Survivininhibitor
TCR	T-Zellrezeptor
Th	T-Helferzelle
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
Treg	Regulatorische T-Zelle
u	unstimuliert
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vs.	<i>versus</i>
wt	Wildtyp
x	mal
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing protein 1</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Hierarchie und Phänotypisierung der frühen Hämatopoese von Stamm- und Vorläuferzellen aus Maus (ma) und Mensch (hu), modifiziert aus <i>Seita and Weissmann, 2010</i> .	2
Abb. 1.2: Übersicht über das blutbildende System. Ausdifferenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzelle zu multipotenten Vorläufern. Diese bilden Zellen der myeloiden und lymphoiden Linie. Modifiziert aus Heylmann et al. 2014.	3
Abb. 1.3: Blutbild von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten in Medullablastoma-Patienten während des Zeitraums einer Bestrahlung des Rückenmarks mit einer kumulativen (angehäuft durch einzelne, fraktionierte Strahleneinheiten) Dosis von bis zu 35 Gy. Erholungsphase von 1 Woche bis 2 Monaten.	16
Abb. 1.4: Induzierte Modifikationen der DNA durch ionisierende Strahlung, die daraus hervorgehenden Signalwege der DNA-Schadensantwort und mögliche „Schicksale“ der Zelle.	18
Abb. 1.5: Entstehung von O ⁶ -Methylguanin durch Temozolomid.	32
Abb. 1.6: Wirkungsweise von Cyclophosphamid bzw. Mafosfamid.	34
Abb. 3.1: Induzierter Zelltod (AnnexinV) von peripheren, humanen Blutzellen 24 h nach ionisierender Strahlung.	67
Abb. 3.2: Relative Anzahl nicht-fragmentierter Zellen zur unbestrahlten Probe (= 1) nach IR innerhalb des SSC/FSC-Blots bzw. Verlust des CD8+ und CD4+ Markers.	68
Abb. 3.3: SSC/FSC und AnnexinV-Färbung aufgereinigter Granulozyten aus unterschiedlichen <i>Buffy-Coats</i> (G1 - G3) 24 h unbehandelt (links) bzw. nach Bestrahlung mit 2 Gy (rechts).	69
Abb. 3.4: Zelltodinduktion von Treg, Th und CTL nach verschiedenen Dosen IR.	70
Abb. 3.5: Induktion und zeitliche Abnahme von γH2AX-Foci als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur in verschiedenen Blutzellpopulationen nach 2 Gy.	72
Abb. 3.6: Repräsentative Bilder der γH2AX-Färbung in Blutzellen vor und nach Bestrahlung mit 2 Gy.	73
Abb. 3.7: γH2AX- und Oberflächenmarker-Färbung am konfokalen Mikroskop (LSM). A: Induktion von γH2AX-Foci 1 h nach IR und persistierende Foci nach 24 h. B: Kinetik von γH2AX-Foci in CD34+ Vorläuferzellen 1 h und 4 h nach IR.	75
Abb. 3.8: Vergleich T-Zelle vs. Monozyt.	76
Abb. 3.9: Behandlungsschema einer Ganzkörperbestrahlung von Leukämiepatienten.	77
Abb. 3.10: Quantifizierung und Vergleich von γH2AX Foci in CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten aus Blutproben von Leukämiepatienten während einer Ganzkörperbestrahlung.	78
Abb. 3.11: γH2AX-Färbung in T-Zellen, Monozyten und Granulozyten von Patienten (P1 - P3) während einer Ganzkörperbestrahlung.	79
Abb. 3.12: γH2AX-Färbung in CD3 markierten T-Zellen (links) und CD14 Monozyten (rechts) einer Blutprobe eines Patienten P4, entnommen direkt nach einer Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy.	80
Abb. 3.13: A: Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl an CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten in PBMCs von P3. B: Die Quantifizierung von CD3+ bzw. CD14+ Zellen erfolgte in je 10 ⁴ PBMCs am Durchflusszytometer.	81
Abb. 3.14: Anzahl von CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten im peripheren Blut von Patienten nach Ganzkörperbestrahlung.	82
Abb. 3.15: Quantifizierung von γH2AX-Foci am LSM in B-Zellen (CD19, grün; P2) und NK-Zellen (CD56, rot; P3) in Patienten während einer Ganzkörperbestrahlung.	82
Abb. 3.16: <i>Buffy Coat</i> vs. BDM: Unterschiedliche Blutquellen für die γH2AX-Färbung.	83

Abb. 3.17: Vergleich der γ H2AX-Färbung in unbehandelten (Ko) und bestrahlten (2 Gy) Blutzellen nach unterschiedlichen Methoden.....	84
Abb. 3.18: Repräsentative Bilder (LSM) von DNA-Schäden (γ H2AX, grün) in Kombination mit dem T-Zellrezeptor (CD3, rot, 1 - 4) oder Monozytenrezeptor (CD14, rot, 5) in unbehandelten (Ko) oder bestrahlten (2 Gy) Blutzellen nach unterschiedlicher Aufarbeitung.	85
Abb. 3.19: DNA-Schäden (γ H2AX) in unbestrahlten und bestrahlten T-Zellen der BDM. Die Fixierung und Färbung der getrockneten Blutaussstriche erfolgte direkt an Tag 0 oder nach Lagerung an Tag 7 bzw. nach 4 Wochen.	86
Abb. 3.20: DNA-Schäden in 2 Gy bestrahlten CD3+ T-Zellen aus der Fingerspitze (BDM) nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Fixierung (A). Vergleich von γ H2AX-Kinetiken in T-Zellen nach verschiedenen Methoden (B).....	88
Abb. 3.21: Die BDM im Mausversuch.	89
Abb. 3.22: Detektion von Proteinen der DNA-Schadensantwort in T-Zellen (CD3, rot; Kern, blau) mittels BDM in unbehandelten (Ko) bzw. 2 Gy bestrahlten Proben: phosphoATM, phosphoKAP1, 53BP1 und RPA (grün).	90
Abb. 3.23: Vergleich der Zellmorphologie CD3/CD28-unstimulierter vs. -stimulierter Lymphozyten (PBLs).	91
Abb. 3.24: Zellzyklusverteilung unstimulierter vs. CD3/CD28-stimulierter Lymphozyten.	92
Abb. 3.25: Vergleich der Induktion der Apoptose (AnnexinV) von unstimulierten und stimulierten peripheren Blutzellen (A) bzw. CD34+ Vorläuferzellen (B) 24 h nach unterschiedlichen Dosen IR.....	93
Abb. 3.26: Vergleich der Zelltodinduktion (AnnexinV) von aufgereinigten und unstimulierten bzw. stimulierten CTL, Th und Treg 72 h nach Bestrahlung mit 0,5 und 1 Gy.	94
Abb. 3.27: Induzierte Apoptose und Nekrose in unstimulierten vs. stimulierten Lymphozyten nach 1 Gy zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	95
Abb. 3.28: SubG1 Messung in unstimulierten und stimulierten PBLs 24 h nach 1 Gy.....	95
Abb. 3.29: Alkalischer <i>Comet</i> Assay zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten.	97
Abb. 3.30: Neutraler <i>Comet</i> Assay zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten.	98
Abb. 3.31: Expression von p53 in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten nach unterschiedlichen Zeitpunkten und einer Exposition von 1 Gy.....	99
Abb. 3.32: Färbung des Fas-Rezeptors in unstimulierten (blau) und stimulierten (rot) PBLs und Analyse am Durchflusszytometer.....	100
Abb. 3.33: Expression und Spaltung der Initiator-Caspasen-8, -9 und -2, der Effektor-Caspasen-3 und -7 sowie PARP-1 in unbestrahlten (Ko) und 1 Gy bestrahlten PBLs nach 6 bzw. 24 h.	101
Abb. 3.34: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität mittels Lumineszenz-Assay in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs), unbehandelt (Ko) oder 24 h nach 1 Gy.	102
Abb. 3.35: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne Pan-Caspase-Inhibition (A links) bzw. mit Pan-Caspase-Inhibition (A rechts) 24 h nach Behandlung.....	103
Abb. 3.36: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne (links) und mit Caspase-2-Inhibition (rechts).....	104
Abb. 3.37: A: Expression und Spaltung von Gasdermin D und Caspase-1 in unbestrahlten (Ko) und 1 Gy bestrahlten Lymphozyten (PBLs) nach 6 bzw. 24 h. B: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne (links) und mit Caspase-1-Inhibition (rechts).....	104
Abb. 3.38: Einfluss des PARP-Inhibitors Olaparib auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.	106

Abb. 3.39: Immunhistochemische Färbung des <i>Apoptosis-Inducing Factor</i> (AIF) in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten, unbehandelt (Ko) und 4 bzw. 24 h nach 1 Gy.....	107
Abb. 3.40: Effekt der Inhibition von ATM, ATR, p53 und RIP1 auf den strahleninduzierten Zelltod in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 24 h nach 1 Gy.	109
Abb. 3.41: Effekt der Inhibition von ATM auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.	110
Abb. 3.42: Effekt der Inhibition von CHK1 und CHK2 auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.	111
Abb. 3.43: Effekt der Inhibition von MRE11 und DNA-PK auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.....	112
Abb. 3.44: Effekt der Vorbehandlung unterschiedlicher Dosen Dasatinib auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.	113
Abb. 3.45: Immunhistochemische Färbung von phospho-ATM (pATM) in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten unbehandelt (Ko) und 0,5 bzw. 3 h nach Exposition mit 2 Gy.	114
Abb. 3.46: Induktion und Phosphorylierung von p53 nach Hemmung von ATM in unbehandelten (Ko) und nach 1 Gy exponierten (3h) unstimulierten und stimulierten Lymphozyten.....	115
Abb. 3.47: Genexpressionsanalyse von unstimulierten vs. stimulierten Lymphozyten mittels <i>Real-Time</i> RT-PCR.	117
Abb. 3.48: Effekt der Survivin-Inhibition (Suri) auf unstimulierte und stimulierte Lymphozyten.....	119
Abb. 3.49: Messung von intrazellulärem ROS in 48 h unstimulierten und stimulierten Lymphozyten.	120
Abb. 3.50: Induzierte, intrazelluläre ROS-Level in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 1 min nach 1 Gy.	120
Abb. 3.51: Effekt der MTH1-Inhibition auf den Zelltod unstimulierter und stimulierter Lymphozyten.....	121
Abb. 3.52: Zelltodinduktion in Lymphozyten 24 h nach CDT-Behandlung.	122
Abb. 3.53: Immunhistochemische Färbung von γ H2AX in unstimulierten und stimulierten CD3+ T-Zellen, unbehandelt (Ko) bzw. 4 und 24 h nach Behandlung mit 0,034 μ g/ml CDT.	123
Abb. 3.54: Zelltodinduktion (AnnexinV/PI) von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 72 h nach Behandlung mit Temozolomid.	124
Abb. 3.55: Zelltodinduktion durch TMZ in aufgereinigten und unstimulierten bzw. stimulierten A: Treg, B: Th und C: CTL.....	125
Abb. 3.56: Messung der induzierten SubG1-Fraktion nach 72 h in TMZ-behandelten A: Treg, B: Th und C: CTL, unstimuliert und CD3-/CD28-stimuliert.....	126
Abb. 3.57: Zelltodinduktion von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 24 h nach Behandlung mit Mafosfamid.....	127
Abb. 3.58: Zelltodinduktion von aufgereinigten Treg, Th und CTL 24 h nach Behandlung mit Mafosfamid.	127
Abb. 3.59: Zelltodinduktion durch Nimustin (A, nach 72 h) und Mitomycin (B, nach 48 h) in aufgereinigten Treg, Th und CTL.....	128
Abb. 4.1: Strahlensensitivität hämatopoetischer Zellpopulationen im Knochenmark und der Peripherie zusammengefasst aus unterschiedlichen Studien der letzten Jahrzehnte.	131
Abb. 4.2: Vorschlag einer Kombinationstherapie bei der Behandlung von Krebs.	158
Abb. 6.1: Isolation von CD56+ NK-Zellen, CD19+ B-Zellen, CD3+ T-Zellen, CD14+ Monozyten und CD34+ Vorläuferzellen mithilfe magnetischer <i>Beads</i>	184
Abb. 6.2: SSC/FSC- <i>Dotblots</i> von aufgereinigten Zellen und Histogramme der AnnexinV-Färbung in unbehandelten (Ko) und 1 Gy exponierten Zellen nach 24 h.	185

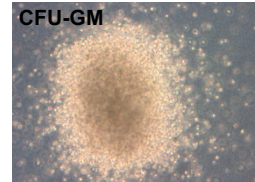
Abb. 6.3: SSC/FSC- <i>Dotblots</i> unstimulierter und stimulierter Lymphozyten (PBLs) sowie Histogramme der AnnexinV-Färbungen in unbehandelten (Ko) und 1 Gy exponierten Zellen nach 24 h.....	186
Abb. 6.4: Abnahme der rechten (roten) Population mit Verschiebung nach links als Folge der Zelltodinduktion bzw. Zellfragmentierung (Kreis) in unbehandelten (Ko) und behandelten (1 Gy) CD34+ Vorläuferzellen (A, nicht-expandierte; B, expandierte CD34+ Zellen).	186
Abb. 6.5: Anteil CD4/CD8/CD25-positiver Zellen nach Ficoll (PBMCs) und nach Isolation mit magnetischen <i>Beads</i> für CTL (CD8), Th (CD4) und Treg (CD4 und CD25).....	187
Abb. 6.6: Aufgereinigte Treg, Th und CTL 4 Tage unstimuliert bzw. stimuliert mit Antikörper gegen CD3 und CD28. Färbung mit PI für Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer.	187
Abb. 6.7: PI-Färbung (SubG1-Assay) von isolierten CD34+ Vorläuferzellen, 3 Tage kultiviert in Medium ohne und mit Zytokinzusatz (expand.).....	188
Abb. 6.8: Apoptose- und Nekrose- <i>Gating</i> am Durchflusszytometer von AnnexinV/PI-gefärbten unstimulierten und CD3-/CD28-stimulierten Lymphozyten (PBLs), 24 h nach Exposition mit 0,5 Gy bzw. unbehandelt (0 Gy).	188
Abb. 6.9: DNA-Einzelstrangbrüche gemessen mittels Alkalischem <i>Comet Assay</i> in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 1 min nach unterschiedlichen Dosen IR.....	189
Abb. 6.10: Analyse der FasR-Expression mittels eFluor®450-gekoppelter Antikörper gegen FasR (CD95) auf A: CTLs und B: Th <i>gated</i> innerhalb unstimulierter und stimulierter Lymphozyten (PBLs).	189
Abb. 6.11: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität mittels Lumineszenz-Assay in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs), unbehandelt (Ko) oder 24 h nach 1 Gy.	190
Abb. 6.12: Immunhistochemische Färbung von PAR zur Bestimmung der PARP-Aktivität in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs) nach 1 Gy IR.	190
Abb. 6.13: Cytold® - Färbung von Lymphozyten zur Messung der Autophagie am Durchflusszytometer.	191
Abb. 6.14: FDG-Färbung von Lymphozyten zur Messung der Seneszenz am Durchflusszytometer.....	191
Abb. 6.15: Inhibition von p53 (A) und ATM (B) vor Exposition mit 1 Gy und Zelltodmessung nach 24 h. .	192
Abb. 6.16: Toxizität der Inhibitoren in Form des induzierten Zelltodes 24 h nach Behandlung.....	192
Abb. 6.17: Sequenz Primer von Sigma <i>Life Science Array_HD/Array_HUMAN</i> , Eurofins <i>Genomics*</i> oder Invitrogen [#]	193

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem baut sich auf ein hierarchisches System hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) des Knochenmarks auf, die durch Selbsterhaltungs- (*self-renewal*) und Differenzierungsschritte verschiedene Arten von Vorläuferzellen bilden und letztendlich als ausgereifte Blutzellen in den peripheren Blutkreislauf entlassen werden (Seita & Weissman, 2010). Die frühen HSCs zeichnen sich durch ihre Multipotenz und Selbsterhaltung aus; sie differenzieren zu Vorläuferzellen der myeloiden (*Common Lymphoid Progenitor*, CMP) und lymphoiden (*Common Lymphoid Progenitor*, CLP) Reihe. Die Differenzierungsschritte von HSCs zu ausgereiften Blutzellen werden durch den Einfluss zahlreicher Zytokine gesteuert (Alexander, 1998; Robb, 2007). Dabei werden die einzelnen Stufen der Differenzierung durch Oberflächenmarker phänotypisiert. Durch Charakterisierung der Oberflächenmoleküle, Glykoproteine und -lipide sowie zellulärer Rezeptoren werden die unterschiedlichen Zelltypen beschrieben (*Cluster of Differentiation* (CD) Nomenklatur) und über spezifische Antikörper nachgewiesen (Civin et al., 1984; Tindle et al., 1985; Zola et al., 2005). Hauptmarker humaner Stamm- und Vorläuferzellen ist CD34, ein Ligand für L-Selektin. CD34 beschreibt somit eine Mischpopulation, wobei CD34-positive(+) Zellen auch verwendet werden, um Stamm- oder Vorläuferzellen anzureichern. Nur 0,5 - 5 % der Zellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark sind CD34-positiv (Civin et al., 1984; DiGiusto et al., 1994; Krause, Fackler, Civin, & May, 1996).

Abb. 1.1 zeigt Hierarchie und Phänotypisierung der frühen Hämatopoese und der Aufteilung in die myeloide und lymphoide Richtung unter Einfluss spezifischer Zytokine (Seita & Weissman, 2010). Frühe HSCs differenzieren in multipotente Vorläuferzellen, die in der Lage sind, Zellen der lymphoiden und myeloiden Linie zu bilden. Die unterschiedlichen Vorläuferzellen können spezifische *Colony-Forming Units* (CFUs) bilden; dies sind Kolonien ausgereifter Vorläuferzellen. Die Bilder zeigen aus peripherem Blut isolierte CD34-positive Zellen, die mittels Zytokin-Cocktails in unterschiedliche Vorläuferzellen bzw. entsprechende Kolonien ausdifferenziert wurden (Methoden 2.2.5 und 2.2.9).



Eine komplette Übersicht der Hämatopoese von der frühen HSC bis zur ausgereiften myeloiden und lymphoiden Blutzelle ist in Abb.1.2 dargestellt (Heylmann et al., 2014). Treten während der Entwicklung einer Blutzelle aufgrund äußerer oder innerer Einflüsse zytogenetische Anomalien auf, die zu chromosomalen Translokationen, Mutationen und somit fehlgeleiteter Genexpressionen führen, können sich während der Hämatopoese myeloische oder lymphatische Leukämien ausbilden. Diese gehen aus Vorläufern der Granulozyten oder Lymphozyten hervor und zeigen eine Häufung bösartiger, sich schnell teilender Zellen mit eingeschränkter Fähigkeit, den programmierten Zelltod einleiten zu können (Aifantis et al., 2008; Buzzeo et al., 2007).

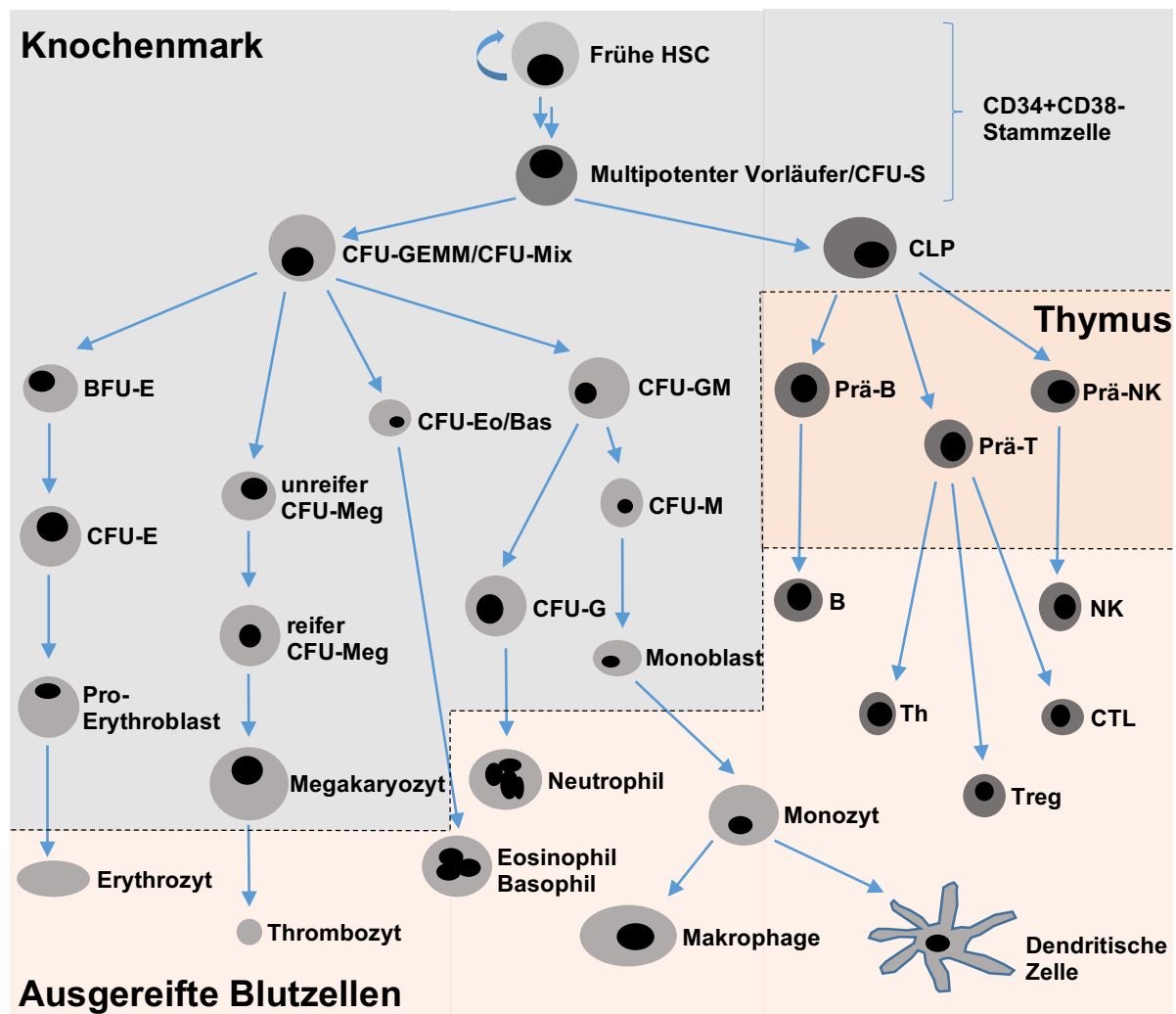


Abb. 1.2: Übersicht über das blutbildende System. Ausdifferenzierung der frühen hämatopoetischen Stammzelle zu multipotenten Vorläufern. Diese bilden Zellen der myeloiden und lymphoiden Linie. Modifiziert aus Heymann et al. 2014.

Man unterscheidet zwischen chronischer und akuter lymphatischer Leukämie (CLL bzw. ALL) und akuter und chronischer myeloider Leukämie (CML bzw. AML), ausgehend von der entsprechenden Linie der entarteten Zellen. Akute Leukämien entwickeln sich schnell, begleitet von heftigen Symptomen, wobei sich vor allem unausgereifte Blutzellen unkontrolliert vermehren. Chronische Leukämien sind schleichend und langsam. Bei den entarteten Zellen handelt es sich in der chronisch ausgeprägten Form um ausdifferenzierte Zellen (DKFZ, Krebsinformationsdienst, 2012).

Der Abwehrmechanismus des Immunsystems wird in zwei Bereiche eingeteilt, die angeborene und erworbene Immunantwort.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem kann in anatomische, biochemische Barrieren und der unspezifischen zellulären Immunantwort zusammengefasst werden (Castelo-Branco & Soveral, 2014).

Physikalische Barrieren gegen Pathogene bilden dabei in erster Linie die Haut bzw. die Schleimhäute, die mit ihren Zilien Fremdkörper entfernen (Jorissen, Willems, & Van der Schueren, 1998) oder IgA zur Abwehr sekretieren können (Jafarzadeh, et al., 2010).

Zellwandkomponenten von Bakterien (insbesondere LPS) und Pilzen sowie virale Nukleinsäuren werden als PAMPS (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) bezeichnet, die von PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) auf antigenpräsentierenden Zellen der angeborenen Immunantwort erkannt werden (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Eine wichtige Klasse dieser PRRs sind die sog. Toll-like Rezeptoren (Takeda & Akira, 2005). Im Folgenden werden Zellen der angeborenen Immunantwort beschrieben:

Monozyten sind phagozytierende Zellen, die Pathogene und tote Zellen erkennen und entfernen. Sie werden hauptsächlich über ihren Oberflächenrezeptor CD14 definiert. Sie generieren über NADPH-Oxidasen und Myeloperoxidasen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie O_2^- , H_2O_2 , OH^- , NO sowie hypochlorige Säure HOCl. Dies geht einher mit der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie der Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 β . Im Gegensatz zu anderen Zelltypen haben Monozyten eine kurze Lebensspanne von nur 48 h im Blutkreislauf, wobei sie den spontanen Zelltod einleiten, wenn sie nicht durch Zytokine zur Ausdifferenzierung angeregt werden. Wandern Monozyten in entzündetes Gewebe ein, so liegt ihre Hauptaufgabe in der Ausdifferenzierung zu Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) (Cathcart, 2004; Parihar et al., 2010; Chan et al., 2012; Gonzalez-Mejia & Doseff, 2009)

Makrophagen sind große, phagozytierende Zellen, die aus Monozyten durch Einfluss der Zytokine GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) und M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) im Gewebe entstehen und ubiquitär im Körper vorkommen (Italiani & Boraschi, 2014; Wiktor-Jedrzejczak & Gordon, 1996). Im Gegensatz zu Monozyten besitzen Makrophagen eine deutliche längere Lebenszeit von Monaten bis Jahren (van Furth & Cohn, 1968). Makrophagen synthetisieren pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 und rekrutieren dadurch z.B. neutrophile Granulozyten zu inflammatorischem Gewebe (Borregaard, 2010). Sie sind auch in der Lage, Antigene für T- und B-Zellen zu präsentieren und produzieren, wie Monozyten, ROS und reaktive Stickstoffspezies, die der Zerstörung entarteter Zellen dienen (Sica & Bronte, 2007; Weiskopf et al., 2009).

Dendritische Zellen sind die Hauptklasse der antigenpräsentierenden Zellen und befinden sich in fast allen Geweben des Körpers, wie in Lymphknoten, Gewebsflüssigkeiten, im peripheren Blut oder als sog. Langerhans-Zellen in der Epidermis, wo sie oft den Erstkontakt zu Pathogenen herstellen (Lambrecht & Hammad, 2009). Namensgebend sind die Zytoplasma-Fortsätze (Dendriten), die die sternförmige Morphologie der unreifen DCs widerspiegeln (Banchereau & Steinman, 1998). Sie phagozytieren, prozessieren und präsentieren Antigene für T-Zellen, die als Teil des adaptiven Immunsystems bei einer erneuten Infektion sofort reagieren können. DCs stellen damit das Bindeglied zwischen angeborener, unspezifischer und der adaptiven Immunantwort dar. Desweiteren regulieren sie die Aktivität von B- und NK-Zellen und sind für die Selbsttoleranz gegenüber Selbstantigenen zuständig (Agrawal & Gupta, 2011). Dabei eliminieren sie selbstreaktive T-Zellen durch Aktivierung ihres extrinsischen Apoptoseweges oder generieren regulatorische T-Zellen (Tan & O'Neill, 2005). Es existieren zwei Gruppen von Dendritischen Zellen: die selten vorkommenden plasmazytoiden DCs mit Vorläufern aus der lymphoiden Reihe und den konventionellen DCs, die aus Monozyten durch die Zytokine GM-CSF und IL-4 ausreifen (Castelo-Branco & Soveral, 2014; Hiasa et al., 2009).

Natürliche Killer (NK)-Zellen haben ihren Namen durch ihr zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen erhalten. Sie werden in zwei Arten eingeteilt, in die zytotoxisch-agierenden (CD56^{dim}CD16⁺) oder zytokinproduzierenden Zellen (CD56^{bright}CD16⁻) (Fauriat et al., 2010; Vivier et al., 2008). Die Aktivierung von NK-Zellen wird durch inhibitorische oder aktivierende Oberflächenrezeptoren (*killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIR) reguliert (Parham, 2005). Diese erkennen konstitutiv exprimierte MHC (*Major Histocompatibility Complex*) I Moleküle auf gesunden Zellen und vermitteln dadurch eine Selbsttoleranz, wohingegen herabregulierte MHC I Moleküle auf gestressten Zellen (auch Tumorzellen) eine zytotoxische Reaktion vermitteln (Vivier et al., 2008). NK-Zellen selbst besitzen aber keine Antigen-spezifischen Rezeptoren (Chaplin, 2010). Sie sekretieren u.a. das immunstimulierende, antivirale und anti-tumorale Interferon- γ , welches auch zytotoxische T-Zellen (CTL) aktiviert. Als zytolytisches Protein wird u.a. Perforin von NK-Zellen ausgeschüttet (Konjevic et al., 1995). Zwei bis 18 % der menschlichen peripheren Blutzellen sind NK-Zellen. Sie werden im Blut ca. alle zwei Wochen ersetzt (Gregoire et al., 2007; Y. Zhang et al., 2007).

Granulozyten sind die am häufigsten im Blut vorkommenden weißen Blutkörperchen. Neutrophile Granulozyten bilden 40 - 80 % der peripheren weißen Blutzellen, Eosinophile 1 - 6 % und Basophile nur 1 - 2 % der Granulozyten. Granulozyten zeigen besondere morphologische Eigenschaften des Zellkerns, der z.T. aus 2 bis 5 Segmenten besteht (polymorphkernig) (Bartova et al., 2001). Die in dieser Arbeit isolierten Granulozyten sind hauptsächlich CD15- bzw. CD64-positive neutrophile Granulozyten (Allen, 2001; Dumitru et al., 2012). Neutrophile Granulozyten haben eine sehr kurze Lebensspanne im peripheren Blut, die je nach Untersuchungsmethode von einer Halbwertszeit von 7 h bis hin zu 3,8 Tagen

reichen kann (Cartwright et al., 1964; Dancey et al., 1976; Dreschet et al., 1975; Pillay et al., 2010; Steinbach et al., 1979). Neutrophile Granulozyten sind phagozytierende Zellen und zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit aus, ROS zu produzieren (Geering et al., 2013; Pillay et al., 2013). So stellen sie über die NADPH-Oxidase 2 (NOX2) u.a. das Superoxid Anion O_2^- her, das mit NO Peroxynitrite bilden kann. O_2^- kann spontan mit Wasser zu H_2O_2 reagieren, welches über die Myeloperoxidase zu hypochloriger Säure ($HOCl$) katalysiert wird. Durch diese ROS und deren Metabolite können T-Zellaktivitäten supprimiert, aber auch Bakterien abgetötet werden (Pillay et al., 2013; Wittmann et al., 2012). Des Weiteren produzieren sie zur Regulation der adaptiven Immunantwort hohe Mengen an IL-12 und IFN- γ (Chaplin, 2010). Eine weitere Eigenschaft von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ist das Bilden und Auswerfen sog. DNA-Fallen, die in der Lage sind, Pathogene zu binden und zu töten (sog. NETs, *neutrophil extracellular traps*). Dabei sterben neutrophile Granulozyten eine Form des Zelltodes, der auch NETosis genannt wird (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Yousefi et al., 2008). Eosinophile Granulozyten haben vielfältige Funktionen im Bereich der Entwicklung von Organen, Antigenpräsentation, allergischen Reaktionen, Wundreparatur, in der Umformung von Geweben, der Beseitigung von Pathogenen, im Wachstum von Nerven sowie in der Produktion der Zytokine IL-2, -4, -5, -8, -10, -13 und GM-CSF (Foster et al., 2011; Jacobsen et al., 2007; Kita, 2011; Rothenberg & Hogan, 2006; Trivedi & Lloyd, 2007). Eosinophile Granulozyten enthalten zytotoxische Moleküle und Enzyme und sind hauptsächlich gegen Helminthen und Parasiten aktiv (Minai-Fleminger & Levi-Schaffer, 2009). Basophile Granulozyten sekretieren u.a. IL-4 und IL-13 sowie große Mengen an Histamin und sind dadurch hauptsächlich an allergischen Reaktionen beteiligt (Karasuyama et al., 2011).

Das angeborene Immunsystem ist über sog. MHC Moleküle der Klasse I und II, die sich an der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen befinden, mit der adaptiven Immunantwort, insbesondere der T-Zellaktivierung, verbunden (Vyas et al., 2008).

Fremdproteine bzw. Pathogene werden von nahezu allen Zellen des Organismus internalisiert, proteasomal degradiert, und die Proteinfragmente (8 – 10 Aminosäuren MHC I, 13 – 17 Aminosäuren MHC II) werden im MHC-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert (Alberts et al., 2002). MHC Klasse I Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Diese werden u.a. durch den T-Zellrezeptor CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen erkannt. MHC Klasse II Moleküle sind primär auf antigenpräsentierenden Zellen (z.B. DCs oder Makrophagen) vorhanden und zeigen Antigene bzw. Proteine, die durch Endozytose aufgenommen und degradiert wurden. Diese werden durch den T-Zellrezeptor von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt (Neefjes et al., 2011).

1.1.2 Das adaptive (erworbene) Immunsystem

Antigen-spezifische T (*thymus-derived*)-Zellen eliminieren virusinfizierte Zellen, Bakterien, Parasiten und entartete Zellen (Broere et al., 2011). Diese Erkennung wird über den T-Zellrezeptor (TCR) vermittelt, der Antigene auf MHC I und II Molekülen erkennt. TCR-Stimulation führt zur Aktivierung vieler intrazellulärer Signalkaskaden. Einmal aktiviert beginnt die T-Zelle zu proliferieren, infiltriert umliegendes Gewebe der Antigenpräsenz und wird zur Effektor T-Zelle, die immunmodulierende Zytokine sekretiert oder Zytotoxizität auslöst. Nicht aktivierte T-Zellen überleben bis zu mehrere Monate bzw. Effektor T-Zellen bis nach Beendigung ihrer Immunantwort. T-Gedächtniszellen können bis zu mehrere Jahre in den lymphoiden Geweben oder im Blut überleben (Broere et al., 2011).

Der T-Zellrezeptor ist ein Komplex aus den variablen α β Heterodimeren und CD3, der aus den Ketten $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ und $\zeta\zeta$ aufgebaut ist. Die α β Heterodimere gehören zur Familie der Immunoglobulin-Familie und werden über genetische Umlagerungsprozesse der DNA (*Desoxyribonucleic acid*) der sog. V(D)J Rekombination geformt (Schatz, 2004). Diese sind für die spezifische Antigenerkennung über MHC-Komplexe erforderlich. Die CD-Ketten zeigen intrazelluläre Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenzen (ITAMs), die nach Aktivierung des TCR für die Einleitung vielfältiger Signalkaskaden, ausgelöst über Protein-Tyrosinkinasen, verantwortlich sind (Broere et al., 2011; Schatz, 2004). So werden die Kinasen Scr (Lck und Fyn) sowie ZAP70 (ζ assoziiertes Protein of 70 kDa) stimuliert, die über PIP2 (Phosphatylinositoldiphosphat) Signalkaskaden Diacylglycerol (DAG) und Inositol-triphosphat (IP3) aktivieren (Bubeck Wardenburg et al., 1996; Smith-Garvin et al., 2009; Zhang et al., 1998). DAG aktiviert über die Phosphokinase C (PKC) die Ras-Signalkaskade, die u.a. die Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinasen stimuliert und somit die Transkriptionsfaktoren AP-1, Jun, Fos und STAT3 aktiviert. Weiterhin wird der AKT-Signalweg aktiviert und die Freisetzung von Calcium gefördert (Downward, 2003; E. Genot & Cantrell, 2000). Die Calcium-aktivierte Antwort ist ein weiterer Hauptprozess der TCR-Aktivierung, die hauptsächlich von IP3 induziert wird. So fördert die erhöhte Menge an einströmenden Calcium nicht nur die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, sondern auch der Calmodulin-abhängigen Transkriptionsfaktoren MEF2 (*myocyte-enhancing factor 2*), DREAM (*downstream regulatory element antagonist modulator*), CaMK (Ca^{2+} -abhängige Kinase) und NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Macian et al., 2002; Savignac et al., 2007; Vallabhapurapu & Karin, 2009). Weiteres Hauptmerkmal der TCR-Aktivierung ist die durch Calcium und Ras-vermittelte Umwandlung des Zytoskeletts und der damit verbundenen Umstrukturierung von Aktin (Billadeau et al., 2007; Burkhardt et al., 2008). Dies resultiert u.a. in morphologischen Veränderungen der stimulierten T-Zelle. Über Umstrukturierung des Aktins, aber auch über DAG, PKC und RAP1 (Ras-assoziiertes Protein1) kommt es weiterhin über ein *Inside-out Signaling* zur Aktivierung von Integrinen (Lafuente et al., 2004; Menasche et al., 2007; Smith-

Garvin et al., 2009). Dabei wird die Zusammensetzung der Integrine und deren Bindungsverhalten zu Liganden auf anderen Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und extrazellulären Proteinen verändert. Generell bewirkt die Aktivierung des TCR komplexe Signalkaskaden im Bereich Zellüberleben, Zellteilung, Zytokinproduktion, sowie Veränderungen des Zytoskeletts und von Integrinfunktionen. Dadurch wird der zelluläre Metabolismus einer Effektorzelle in Gang gesetzt, der eine Immunantwort, Entzündung und einen Abwehrmechanismus gegen Pathogene einleitet. Wichtige negative Regulatoren der T-Zellaktivierung sind die Oberflächenmoleküle CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocytes antigen*), mit den Liganden CD80/86, und PD-1 (*programmed death-1*), der die Liganden PD-L1 und PD-L2 bindet. Diese rekrutieren u.a. die Phosphatase SHP1, die LCK dephosphoryliert und eine Weiterleitung des Signals des TCR unterbindet (Smith-Garvin et al., 2009). CTLA-4 und PD-1 stehen zurzeit stark im Fokus der klinischen Forschung, da vor allem Tumorzellen Liganden (wie z.B. PD-L1) an der Oberfläche tragen, die die Stimulation von T-Zellen hindern und somit vom Immunsystem unerkant bleiben (Callahan et al., 2014; Quezada & Peggs, 2013).

Für T-Zellen gibt es zwei weitere Hauptrezeptoren: CD4 für T-Helferzellen und CD8 für zytotoxische T-Zellen. Einmal aktiviert, beginnen T-Zellen den CD69 und CD25 (IL-2Ra) zu exprimieren. CD28 ist ein weiterer Ko-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen und wichtig für deren Stimulation. Er bindet an CD80 und CD86 und induziert die IL-2 Produktion in T-Zellen. Weiterhin führt die Aktivierung von CD28 zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zellen und zur Erhöhung der Glykolyse (Frauwirth et al., 2002). Wird eine T-Zelle über ihren TCR und CD28 aktiviert, so ändert sie ihren naiven (ruhenden) Zustand in den einer T-Effektorzelle (Broere et al., 2011).

Potentielle Effektorzellen werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, die CD8+ zytotoxischen T-Zellen und CD4+ T-Helferzellen.

CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTLs) erfüllen ihre Funktion über zwei Wege, um Zielzellen zu zerstören. Ein Weg ist die Ca^{2+} -abhängige Sekretion von Perforin und Granzym B nach TCR-Stimulation, die in den Zielzellen Caspasen aktivieren und somit Apoptose aber auch Nekrose auslösen (Barry & Bleackley, 2002; Darmon et al., 1995; Henkart, 1985). Granzym B kann auch Caspase-unabhängig über eine direkte Aktivierung von CAD (*caspase-activated deoxynuclease*) DNA-Schäden verursachen und den Zelltod einleiten (Bluestone & Tang, 2005; Heusel, et al., 1994; Sharif-Askari et al., 2001; Thomas et al., 2000). Ein weiterer Mechanismus ist die CTL-bedingte Aktivierung des CD95 Rezeptors (FasR) auf der Zielzelle. Nach TCR-Stimulation wird der CD95-Ligand auf CTLs exprimiert, der FasR auf der Zielzelle aktiviert und somit eine Caspasekaskade in Gang setzt, die Apoptose auslöst (Broere et al., 2011; Kagi et al., 1994).

CD4+ T-Helferzellen (Th) werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt; Th1-Zellen produzieren immunmodulierendes Interferon (IFN)- γ , IL-2 und TNF- β . So vermitteln sie eine Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie Mykobakterien und aktivieren mikrobiozide Funktionen von Makrophagen (Mosmann & Coffman, 1989; Paul & Seder, 1994; Suzuki et al., 1988; Zhu & Paul, 2008). Des Weiteren bilden sie Th1-Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit einem Antigen schnell reaktiviert werden können (Darrah et al., 2007).

Th2-Zellen sekretieren IL-4, -5, -6, -10 und -13, sind an der Aktivierung von B-Zellen beteiligt und fördern deren Produktion von Immunglobulin(Ig)G-, IgA- und IgE (Broere et al., 2011). Sie induzieren Abwehrmechanismen gegen Helminthen (Würmer) und spielen eine wichtige Rolle in der Pathologie von Asthma und allergischen Reaktionen (Mosmann & Coffman, 1989; Paul & Seder, 1994; Zhu & Paul, 2008). Durch das Anregen der IgE-Produktion in B-Zellen werden basophile Granulozyten und Mastzellen aktiviert und zur Histamin- und Serotonin-Ausschüttungen stimuliert (Kopf et al., 1993; Zhu & Paul, 2008). Des Weiteren rekrutieren Th2-Zellen eosinophile Granulozyten (Coffman et al., 1989). Das von Th2-Zellen sekretierte IL-10 ist in der Lage, die Proliferation von Th1-Zellen zu unterdrücken und die Funktion von DCs zu hemmen (Fiorentino et al., 1989; Moore et al., 2001). Eine weitere Population sind die IL-17-produzierenden Th17-Zellen, die Abwehrmechanismen gegen Bakterien und Pilzen bilden und neutrophile Granulozyten aktivieren (Weaver et al., 2006).

CD4+ CD25+ regulatorische T-Zellen (Treg) haben einen besonderen Status in der Immunantwort, da sie diese herabregulieren, eine Toleranz vermitteln und Autoimmunerkrankungen verhindern. Diese Toleranzentwicklung ist aber besonders kritisch, wenn dadurch Krebszellen geschützt werden. Naive Treg sind u.a. charakterisiert durch die Expression des IL-2 Rezeptors CD25 und den Transkriptionsfaktoren FoxP3 und Helios. Treg können auch durch Exposition mit den Zytokinen TGF (*transforming growth factor*)- β und IL-10 aus peripheren CD4-positiven Th-Zellen entstehen und bilden somit peripher induzierte Treg (Broere et al., 2011; Gottschalk et al., 2012; Vignali et al., 2008). Treg vermitteln ihre Funktion über mehrere Mechanismen. So können sie durch die immuninhibitorischen Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35 die Aktivität von Effektor T-Zellen hemmen (Asseman et al., 1999; Collison et al., 2007; Nakamura et al., 2004; Schmidt et al., 2012). IL-10 ist in der Lage, die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen zu inhibieren, die Produktion von IL-2, TNF- α und IL-5 zu unterdrücken und auch MHC-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen herabzuregulieren (Broere et al., 2011; Vignali et al., 2008). Weiterhin können sie T- und B-Zellen durch die Granzyme A und B lysieren und durch ein Abfangen von IL-2 die Funktion von T-Zellen unterdrücken (Allen, 2001; de la Rosa et al., 2004; Grossman et al., 2004; Herman et al., 2004; McHugh et al., 2002; Thornton & Shevach, 1998; Zhao et al., 2006). Treg supprimieren auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte die Ausreifung und Funktion von DCs. Das auf Treg befindliche CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) vermittelt über CD80/CD86-

Rezeptoren auf DCs eine Induktion von Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), das über den Tryptophan-Stoffwechsel für T-Zellen pro-apoptotische Metabolite induziert (Bluestone & Tang, 2005; Fallarino et al., 2003; Mellor & Munn, 2004; Read et al., 2000).

B (bone marrow-derived) Zellen stellen einen Anteil von ca. 15 % der Gesamtleukozyten im peripheren Blut dar und sind u.a. durch den Oberflächenmarker CD19 charakterisiert (Chaplin, 2010; Wang et al., 2012). Sie exprimieren während ihrer Entwicklungsphase über die VDJ-Rekombination klonal unterschiedliche Oberflächenrezeptoren, die sog. Immunglobuline (Antikörper), die spezifische Antigene erkennen (LeBien & Tedder, 2008). Während der Ausreifung exprimieren B-Zellen an der Oberfläche IgM- und IgD-Rezeptoren. Werden diese durch Antigene und T-Helferzellen stimuliert, kommt es zu somatischen Hypermutationen innerhalb der Antikörpergene und zu Klassenwechsel der Immunglobuline (IgG, IgE, IgA) auf den B-Zellen. Als Folge dessen differenzieren B-Zellen zu Antikörper-produzierenden und -sekretierenden Plasmazellen (Chaplin, 2010; Eibel et al., 2014). Antikörper dienen u.a. zur Opsonisierung von Pathogenen, wodurch sie z.B. von phagozytierenden Zellen erkannt und entfernt werden (Schwenk et al., 2003). Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren dabei auch über den klassischen Weg kaskadenförmig das Komplementsystem, welches aus über 25 Proteinen, meist Proteinasen, besteht (Carroll, 2004; Chaplin, 2010). Ziel des Komplementsystems ist u.a. das Markieren bzw. Opsonisieren von Zielstrukturen für Immunzellen, der Induktion von Entzündungen und der osmotischen Lyse von Zielzellen (Tedesco, 2008). Weitere Möglichkeiten der Komplement-Aktivierung bestehen aus dem Ausschalten inhibitorischer Faktoren durch bakterielle Antigene oder sie wird über Lektine vermittelt, die Mannose-Strukturen auf Pathogenoberflächen erkennen (Botto et al., 2009; Harboe & Mollnes, 2008).

1.1.3 Das Immunsystem in der Tumorumgebung

Das Mikromilieu des Tumors ist sehr von antitumoralen und Tumor-protectiven Immunzellen infiltriert (Gajewski et al., 2013). Dieses Zusammenspiel beschreibt das sog. *Immunoediting*, dabei schützt das Immunsystem den Körper vor dem Entstehen von Tumorzellen, kann aber auch die Entwicklung des Tumors fördern (Vesely et al., 2011). Die drei Phasen des *Editing* bestehen aus der Eliminierung, dem Gleichgewichtszustand und dem Entkommen der Tumorzellen. In der Eliminierungsphase werden die Tumorzellen von Immunzellen erkannt und entfernt. In der Gleichgewichtsphase entkommen einige Tumorzellen der Immunerkennung, indem sie sich in einen Ruhezustand begeben und mutieren (Dunn et al., 2002). Als Folge können die veränderten Tumorzellen nicht mehr vom Immunsystem erkannt werden und entkommen dem Immunsystem (*tumor evasion*) (Topfer et al., 2011). Krebszellen setzen immunsuppressive Zytokine frei und rekrutieren Tumor-protective Immunzellen wie

Treg (Ahmad et al., 2004). Viele Tumore sind deutlich von Treg infiltriert. Die Stärke der Infiltration geht z.B. für das Glioblastom, ein sehr aggressiver und unheilbarer Hirntumor, mit einem erhöhten Tumorgrad und der Schwere der Erkrankung einher (Heimberger et al., 2008; Wainwright et al., 2011). Weiterhin induzieren Tumorzellen sog. TAMS (*Tumor Associated MacrophageS*). Diese M2-Makrophagen sekretieren immunsuppressive Zytokine wie IL-4, -10, -13 und TGF- β sowie Glukokortikoid-Hormone. Dadurch werden Entzündungsfaktoren herabreguliert und die Angiogenese gefördert (Luo et al., 2006; Parihar et al., 2010; Sica & Bronte, 2007). Auch DCs werden von Krebszellen rekrutiert und beeinflusst. Krebszellen hindern das Ausreifen von DCs durch Chemokine wie MIP3 α und SDF-1 (Palucka et al., 2010). DCs gelangen somit in einen Tumor-protektiven Status und können T-Helferzellen zu Tumorschützende, regulatorische T-Zellen ausdifferenzieren (Aspord et al., 2007; Kushwah & Hu, 2011). Wird ein Tumor bestrahlt oder mit Chemotherapeutika behandelt, hat dies auch Einfluss auf das Gleichgewicht der Immunzellen im Tumorgewebe und kann dieses in Richtung Tumorerstörend oder in Tumor-protektiv verschieben (Nishikawa & Sakaguchi, 2010). So führt die Behandlung des Glioblastoms zwar zum Abtöten der malignen Zellen, das Immunsystem wird aber in Richtung Tumor-schützende Treg verschoben, wobei anti-tumorale NK-Zellen oder T-Effektorzellen depletiert werden (Fadul et al., 2011; Sengupta et al., 2012). Somit ist die Berücksichtigung der Immuntoxizität bei der Behandlung maligner Erkrankungen von äußerster Wichtigkeit, da durch therapeutische Interventionen die antitumorale Immunantwort moduliert und somit der Therapieerfolg beeinflusst wird.

1.1.4 Immuntherapie und therapeutische Modulation des Immunsystems

Die Immuntherapie hat zum Ziel, das Immunsystem des Patienten gezielt gegen Tumorzellen zu stimulieren bzw. zu *primen*. Man unterscheidet zwischen passiver und aktiver Immuntherapie (Thomas et al., 2012; Vauleon et al., 2010).

Zur passiven Immuntherapie gehört die adaptive Immuntherapie. Dabei werden T- oder NK-Zellen dem Patienten entnommen, *ex vivo* expandiert, selektiert und durch Zugabe von Tumorantigenen modifiziert. Die TCR-stimulierten, Tumor-spezifischen Zellen werden in den Patienten re-infundiert (Restifo et al., 2012; Zamai et al., 2012). Eine weitere Art der passiven Therapie sind monoklonale Antikörper, die dem Patienten direkt injiziert werden und Immuncheckpoints blockieren. So inhibiert z.B. Ipilimumab den CTLA-4 Signalweg, wodurch die antitumorale T-Zellaktivität gesteigert werden kann. Diese Therapieform ermöglichte Melanompatienten in Phase III Studien ein verlängertes Überleben (Leach et al., 1996; Scott et al., 2012). Zudem können Antikörper Tumorzellen umschließen (anti-HER2, Trastuzumab; anti-EGFR, Cetuximab) und über FC-Rezeptoren DCs aktivieren. Dadurch wird u.a. die Phagozytose aktiviert, Tumorantigene an der DC-Oberfläche präsentiert und Moleküle wie

CD40, CD80 und CD86 exprimiert, die Tumor-spezifische T- und NK-Zellen induzieren (Correale et al., 2012; Dougan & Dranoff, 2009; Vanneman & Dranoff, 2012). Zusätzlich können NK-Zellen mit sog. KIR-spezifischen Antikörpern re-aktiviert werden, die inhibitorische KIRs blockieren und infolgedessen eine antitumorale Antwort auslösen (Romagne et al., 2009; Vivier et al., 2008). Zurzeit klinisch stark im Fokus ist die Inhibition des PD-1 Signalweges mit Antikörpern gegen PD-1 (Nivolumab oder Pembrolizumab) und PD-L1 (BMS-936559), die nachweislich zu einer Wiederherstellung der tumorgerichteten T-Zellproliferation und einer Tumorregression von Melanom, Lungen- und Nierenkrebspatienten führen (Brahmer, 2014; Brahmer et al., 2012; He et al., 2015; Scott et al., 2012). Zur passiven Therapie zählt auch die Stimulation des Immunsystems durch Zytokine wie IL-2. Diese Art der Behandlung führte schon in Melanom- oder Darmkrebspatienten zu einem verbesserten Therapieerfolg (Dillman, 2011; Thomas et al., 2012).

Die aktive Immuntherapie bezeichnet das Aktivieren des kompletten Immunsystems durch das Präsentieren Tumor-spezifischer Antigene. Hierbei werden zwei Arten unterschieden: Vakzine bestehend aus Peptiden oder aus Zellen (Thomas et al., 2012; Yamanaka, 2008). Tumorpeptide, die als Vakzine in Frage kommen, sind meist neun Aminosäuren groß, werden nach Gabe von MHC I Molekülen präsentiert und aktivieren den TCR u.a. von zytotoxischen T-Zellen (Slingluff, 2011). Für die Zell-basierte Therapie werden hauptsächlich antigenpräsentierende DCs verwendet (Van Gool et al., 2009; Vauleon et al., 2010). DCs werden aus peripheren Blut des Patienten isoliert, *ex vivo* mit GM-CSF und IL-4 ausgereift und mit Tumorantigenen aktiviert. Die modifizierten DCs werden in die Lymphknoten der Patienten oder direkt in den Tumor injiziert (Thomas et al., 2012).

Weitere Möglichkeiten der Modulation des Immunsystems hin zu einer tumoralen Antwort liegen in der selektiven Depletion Tumor-schützender Blutzellen, um somit das Gleichgewicht in Richtung Effektor T-Zellen zu verlagern. So kann die Anzahl an Treg durch spezifische monoklonale Antikörper gegen GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*), CTLA-4, FR4 (*Folat Receptor 4*), OX40 und CD25 herabreguliert und in ihrer Funktion eingeschränkt werden (Nishikawa & Sakaguchi, 2010; Onizuka et al., 1999). Des Weiteren kann mit Denileukin difitox spezifisch IL-2 neutralisiert und die Treg-Expansion und Aktivität herabreguliert werden (Attia et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Treg-Depletion besteht in der Behandlung mit geringen Dosen des Krebsmedikaments Cyclophosphamid, wobei es zur Zunahme der antitumoralen Immunantwort kommt (Heylmann et al., 2013; Lutsiak et al., 2005). Weiterhin können TAMs selektiv ausgeschaltet werden. So wird die Überexpression von Legumain, einer Asparaginyln-Endopeptidase, auf TAMs ausgenutzt, um mit einem Legumain-basierendem DNA-Vakzin gezielt CTLs gegen diese zu aktivieren (Luo et al., 2006).

Ein weiterer Punkt, der hier in Bezug der Immunmodulation erwähnt werden sollte, ist der sog. abskopale Effekt. So führt die Bestrahlung eines Tumors zur vermehrten Freisetzung von Antigenen und dadurch zu einer erhöhten Infiltration von Immunzellen. (Lugade et al., 2005; Park et al., 2014). Die Effekte, die dabei auftreten, sind sehr komplex. So kann z.B. die lokale Bestrahlung eines Tumors systemische Wirkungen hervorrufen und das Immunsystem auch gegen Tumore an entfernten Stellen aktivieren. Dies bezeichnet man als abskopische Wirkung und geht einher mit strahleninduzierter Freisetzung tumoraler Antigene, erhöhter Infiltration von Effektorzellen, einem strahleninduzierten Anstieg antigenpräsentierender Zellen und weiterer immunaktivierender Faktoren (Park et al., 2014).

Alle hier genannten Möglichkeiten des Triggers bzw. Aktivierung der antitumoralen Immunantwort führen letztendlich über verschiedene Wege zur Stimulation des TCR und somit zur Aktivierung von Effektor-T-Zellen.

1.2 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung (*Ionizing Radiation*, IR) ist allgegenwärtig. Flugpersonal und -reisende sowie Astronauten sind erhöhter kosmischer Strahlung ausgesetzt (Alvarez et al., 2016). Beispiele von Risikogebieten mit erhöhter Strahlenbelastung sind u.a. Lagerungshalden für den aus Kernkraftwerken stammenden radioaktiven Abfall oder Regionen zur Durchführung von Nuklearwaffentests. Minenarbeiter im Uranerzbergbau wie z.B. in Namibia, sind erhöhter Strahlung ausgesetzt, sowie Aufräumarbeiter und die angesiedelte Bevölkerung der Hochrisikogebiete nach den Reaktorunfällen in Fukushima und Tschernobyl (Etherington et al., 2014; Hirose, 2012; Yamada & Wang, 2007; Zaire et al., 1996). Julie Ryan beschreibt ionisierende Strahlung passenderweise nach dem gleichnamigen Western von Sergio Leone als „*The good, the bad and the ugly*“ (Ryan, 2012). Denn Strahlung ist auch als „*the good*“ in der Therapie folgenschwerer Erkrankungen nicht mehr wegzudenken. Die Strahlentherapie wird bei über 50 % der Krebspatienten, oft in Kombination mit operativer Resektion des Tumors und Chemotherapie, angewendet (Begg et al., 2011; Delaney et al., 2005). Ziel ist es, Krebszellen direkt zu exponieren und so zu schädigen, ohne dabei umliegendes, gesundes Gewebe zu zerstören (Bhide & Nutting, 2010). In geringen Dosen wird IR des Weiteren in der Behandlung von Entzündungen wie der Arthritis eingesetzt, wobei die Prozesse der Heilung bzgl. einer Modulation des Immunsystems in Richtung entzündungshemmend nicht vollständig verstanden sind (Rodel et al., 2012). Anwendung findet diese Behandlung u.a. in sog. Radon-Heilstollen, wo Patienten radonhaltige Luft einatmen. Die Behandlungsmethode wird kontrovers diskutiert, stellt man heilende Effekte mit einer möglichen Gefahr der Lungenkrebsentstehung gegenüber (Falkenbach et al., 2005; Zdrojewicz & Strzelczyk, 2006).

1.2.1 Definition und Klassifikation der IR und Fallbeispiele zur Exposition

Ionisierende Strahlung besteht aus Partikeln oder Photonen, die genug Energie erzeugen, um ein Elektron aus einem Atom oder Molekül zu entlassen und dieses somit ionisieren (Rendic & Guengerich, 2012). Sie wird in vier Arten unterteilt:

Alphastrahlung besteht aus zwei Protonen und zwei Neutronen und entspricht damit einem zweifach ionisierten Heliumkern. Sie wird unter anderem beim Zerfall des Radiums zu Radon abgegeben, hat eine geringe Reichweite und kann mit einem Blatt Papier abgeschirmt werden.

Betastrahlung besteht aus Elektronen (e^-). Typischer Betastrahler ist zum Beispiel das ^{40}K -Isotop, welches unter Abgabe von e^- zu ^{40}Ar oder ^{40}Ca zerfällt. e^- können durch ein Aluminiumblech abgefangen werden.

Die energetisch stärkste Strahlung ist die Gammastrahlung (γ -Strahlung), die u.a. in der Strahlentherapie eingesetzt wird. Gammastrahlung ist elektromagnetische Strahlung und besteht aus ungeladenen Photonen, die Materie in hohem Maße durchdringen können. Die Gammastrahlung wird von Atomkernen ausgesendet, die sich nach einem Alpha- oder Betazerfall in einem angeregten Zustand befinden. Beispiele von Gammastrahlungsquellen sind der Zerfall von ^{60}Co zu ^{60}Ni oder das radioaktive Isotop ^{137}Cs . Zur Abschirmung von Gammastrahlung wird z.B. 5 cm dickes Blei verwendet. Gammastrahlung und Röntgenstrahlung sind identisch, unterscheiden sich aber in ihrem Ursprung. So entsteht Röntgenstrahlung außerhalb des Atomkerns u.a. über ein Abbremsen von Elektronen (Bremsstrahlung) und ist generell weniger energiereich als Gammastrahlung. Die vierte Klasse ionisierender Strahlung sind freie Neutronen. Treffen diese auf Materie, ionisieren sie indirekt Atome bzw. werden von diesen eingefangen, wobei sich radioaktive Isotope bilden können. Aufgrund ihrer nicht vorhandenen Ladung können Neutronen Materie sehr leicht durchdringen und müssen durch wasserstoffreiche Materialien wie Wasser, Plastik oder Paraffin abgeschirmt werden (EPA, 2007; IARC, 2012).

Die Einheit der durch ionisierende Strahlung verursachten Energiedosis wird in Gray (Gy) angegeben. 1 Gy ist dabei die Energie von 1 Joule pro 1 kg. Der Begriff Sievert (Sv) beschreibt die äquivalente Dosis, die beim Durchdringen von biologischem Gewebe letztendlich im Ziel ankommt. Dabei wird die Dosis in Gy mit einem spezifischen Gewichtungsfaktor multipliziert. Im Falle der hoch energetischen Gammastrahlung ist Sv mit Gy identisch (IARC, 2012).

Folgende Tabelle liefert Situationsbeispiele und Folgen nach Exposition mit entsprechenden Dosen an IR:

Situation	Dosis (Gy)
Lokale Strahlentherapie (fraktioniert 1,8 - 2,5 Gy)	30 - 70
Tödlich innerhalb von Wochen	10
Tod von Tschernobyl-Arbeitern innerhalb eines Monats	6
50 %ige Mortalität innerhalb eines Monats	3 - 5
Akute Strahlenkrankheit (Schwindel/Fieber/Erbrechen/weiße Blutkörperchen↓)	1 - 4
5 %ige erhöhte Krebsinsidenz nach mehreren Jahren	1
Maximale Strahlung Fukushima Kraftwerk (pro Stunde)	0,4
Maximal empfohlene Dosis für Arbeiter im Strahlenbereich in 5 Jahren	0,1
Niedrigste Jahresdosis für ein nachgewiesenes Krebsrisiko	0,1
Computertomographie (CT, Ganzkörper)	0,01
Jährliche natürliche Hintergrundstrahlung	0,002
Mammographie	0,0004
Flug 8 h, in 12 km Höhe	0,00004
Röntgen der Zähne	0,00001

("Radiation exposure: a quick guide to what each level means," 2016)

Die strahlensensitivsten Systeme des menschlichen Körpers sind in erster Linie der Fortpflanzungsapparat, der Gastrointestinaltrakt, die Haut, die Muskeln, das Gehirn und vor allem das Knochenmark bzw. die Zellen des Immunsystems (Cox, 2010; Hall, 2006; Heylmann et al., 2014; Ryan, 2012).

So zeigten Medullablastoma-Patienten (Hirntumorkranken mit Metastasen entlang des Rückenmarks) während der Strahlentherapie nach einer kumulativen Dosis von 5 Gy eine massive Depletion an Lymphozyten auf $\frac{1}{4}$ der Ausgangszellzahl im Blutbild, während neutrophile Granulozyten und Monozyten auf 50 % abfallen (Abb. 1.3). Im weiteren Verlauf der Therapie fallen Lymphozyten weiter ab, während die Anzahl neutrophiler Granulozyten auf diesem Level persistiert, Monozyten sogar wellenartig einen An- und Abstieg der Zellzahl zeigen und sich schon während der Therapie knapp unterhalb des Ausgangsniveaus einpendeln. 1 Woche nach einer kumulativen Dosis von 35 Gy zeigen Lymphozyten wie auch neutrophile Granulozyten eine Erholung bzw. Wiedergewinnung der Ausgangszellzahl (Heylmann et al., 2014; Plowman, 1983).

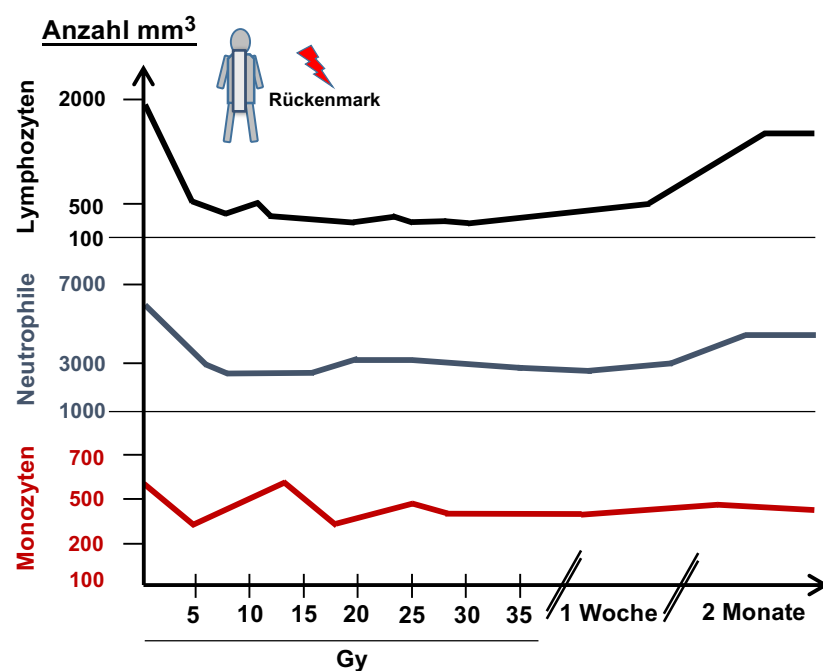
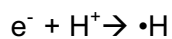
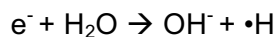
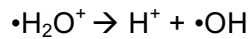
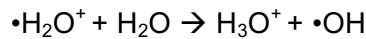
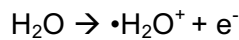


Abb. 1.3: Blutbild von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten in Medullablastoma-Patienten während des Zeitraums einer Bestrahlung des Rückenmarks mit einer kumulativen (angehäuft durch einzelne, fraktionierte Strahleneinheiten) Dosis von bis zu 35 Gy. Erholungsphase von 1 Woche bis 2 Monaten. Schematisch adaptiert von Plowman (Plowman, 1983).

Diese deutliche Abnahme an Lymphozyten, insbesondere der T-Zellen, konnte auch bei Überlebenden des Atombombenangriffs auf Hiroshima und den Überlebenden der nuklearen Katastrophe von Tschernobyl festgestellt werden (Akiyama, 1995; Bebeshko et al., 1991; Gruzdyev et al., 1993; Gurmanchuk et al., 1991; Yarilin et al., 1993).

1.2.2 Biologische, zelluläre Effekte von IR

Weshalb ist IR so toxisch? Man unterscheidet zwischen indirekten und direkten Effekten. IR führt hauptsächlich zur Radiolyse von Wasser. Dabei entstehen hochreaktive Radikale:



Diese freien Radikale ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{H}/\text{e}^-$) sind in der Lage, DNA und andere Biomoleküle indirekt über H_2O zu modifizieren bzw. zu schädigen. IR kann die DNA auch durch Kollision direkt ionisieren und verändern und zum Bruch des DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrats führen (Ouchi, 2012). Die Dosis von 1 Gy IR induziert pro Säugetierzelle ca. 850 Pyrimidin- und 450 Purinläsionen, 1000 DNA-Einzelstrangbrüche (SSB, *single strand breaks*) und 20 – 40 DNA-Doppelstrangbrüche (DSB, *double strand breaks*) (Cadet et al., 2008; Lomax et al., 2013). Täglich werden bis zu 50 000 DNA-Läsionen durch endogenes ROS in einer Zelle induziert. Da erscheint eine zusätzliche Menge von 3000 Läsionen durch IR (2 Gy, therapierelevante Dosis) wenig, ist aber aufgrund des geballten Auftretens unterschiedlicher, komplexer DNA-Schadens-Cluster toxisch. So induziert IR neben 8-Oxoguanin, Thyminglykol und SSB vor allem DSB als toxische Hauptläsion (Lomax et al., 2013). Diese Schädigungen der DNA lösen in der Zelle hochkomplexe Mechanismen aus, die auch unter dem Begriff der DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA damage response*) bekannt sind. Sie können in der Zelle zu vielfältigen Endpunkten führen (Abb. 1.4). Der Weg der Strahlung (*Track*) erzeugt über H_2O in der Zelle ROS, die zu Lipidperoxidationen, Basenmodifikationen, AP (apurine/apyrimidine) Stellen, SSB und DSB führen.

DSB werden durch DNA-Schadenssensoren wie den MRN-Komplex oder ATM erkannt, was zu Phosphorylierungsschritten und Signalweiterleitungen führt. Doppelstrangbrüche der DNA können über die Nicht-Homologe End-zu-Endverknüpfung (NHEJ), im Falle des Vorliegens einer homologen DNA Sequenz in der G2-Phase über die Homologe Rekombination (HR) repariert werden. Durch ROS verursachte Basenmodifikationen werden über die Basenexzisionreparatur (BER) repariert, wobei als Intermediate auch SSB entstehen. Überlappen diese SSB bzw. proliferiert die Zelle zu diesem Zeitpunkt, ist die Folge ein Replikationsblock, der wiederum zu einem DSB führen kann (Abb. 1.4). Je nach funktioneller Beschaffenheit kann die Zelle vor, während oder nach Reparatur der DNA-Schäden den

Zelltod einleiten, oder der Schaden kann zu Überleben, Gen-Mutationen, Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Autophagie führen (Roos et al., 2016).

Fehler in der DNA-Reparatur können auch zu Mutationen und zur Karzinogenese führen. Tritt dies in Vorläuferzellen während der Hämatopoese auf, ist die Gefahr der Entstehung von Leukämien groß (Corces-Zimmerman & Majeti, 2014; Ouchi, 2012).

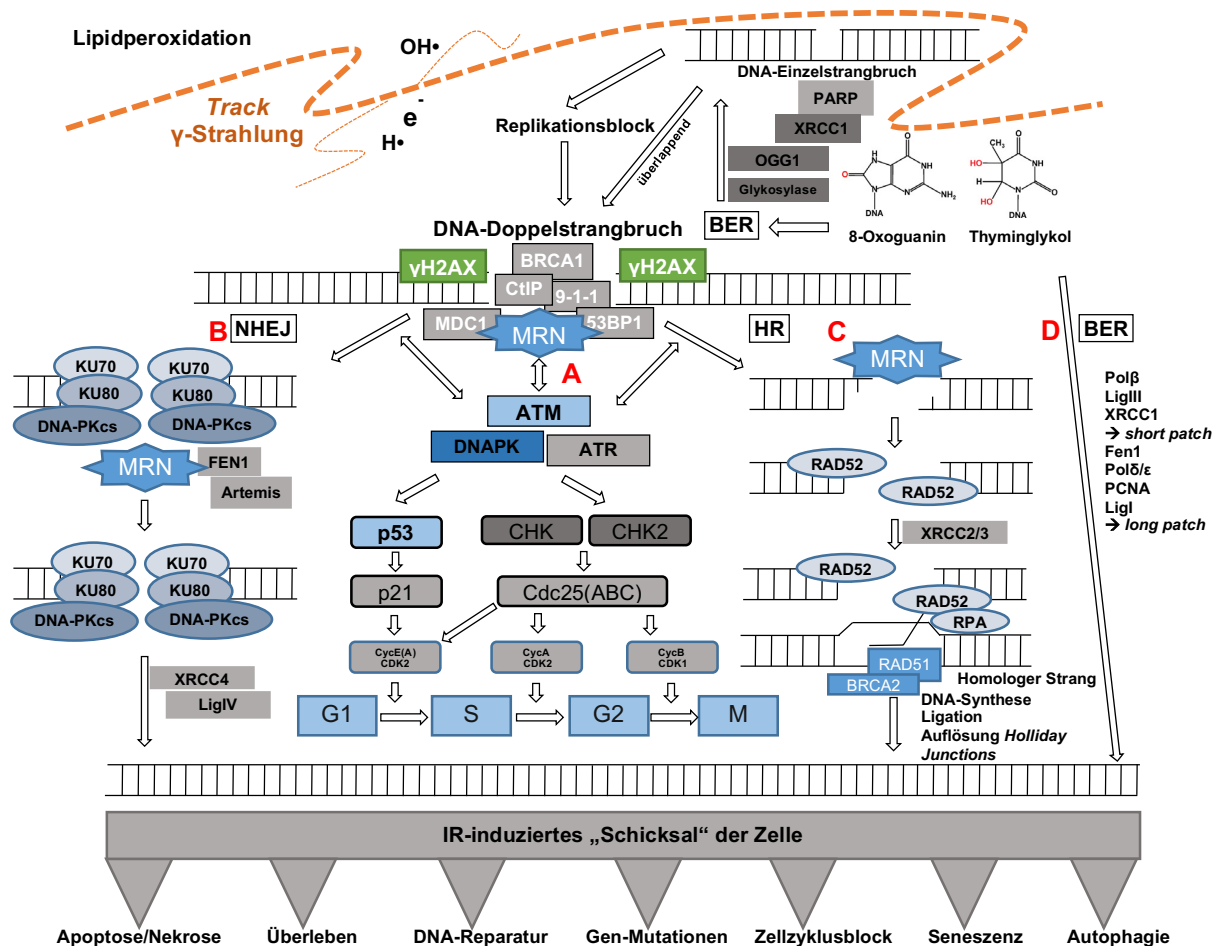


Abb. 1.4: Induzierte Modifikationen der DNA durch ionisierende Strahlung, die daraus hervorgehenden Signalwege der DNA-Schadensantwort und mögliche „Schicksale“ der Zelle. Der Weg hochenergetischer Photonen der γ-Strahlung hinterlässt reaktive Radikale und Sauerstoffspezies, die Lipidperoxidationen, Basenmodifikationen, DNA-Einzelstrangbrüche und als Hauptläsion DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. DSB werden durch Sensoren wie dem MRN-Komplex (MRE11-NBS1-Rad50) und ATM erkannt, was u.a. zur Phosphorylierung des Histons 2AX und weiterer signalgebender Proteine führt (A). Der DSB kann über das NHEJ (B) oder, falls eine homologe DNA-Sequenz in der G2 oder M Phase vorliegt, über die HR (C) repariert werden. Basenmodifikationen wie 8-Oxoguanin werden über die BER (D) repariert, wobei SSB als Intermediate entstehen. Überlappen SSB bzw. treten sie in proliferierenden Zellen auf, kommt es zum Replikationsblock, der wiederum DSB erzeugt. DNA-Schadenssensoren wie der MRN-Komplex, ATM, ATR und DNA-PK leiten Signale zur Zellzyklusregulation und -stop weiter. Dabei wird auch p53 phosphoryliert, das als „Wächter des Genoms“ vielfältigen Einfluss auf das Schicksal der Zelle hat. Die durch IR ausgelösten, hochkomplexen Prozesse können zum Zelltod führen oder einhergehen mit profizienter oder fehlerhafter Reparatur von DNA-Schäden, Gen-Mutationen und dem Auslösen zellulärer Zustände einer Seneszenz oder Autophagie und dem Überleben der Zelle. Grafik wurde zusammengestellt aus Teilen von Christmann et al., 2003; Gaziev & Shaikhaev, 2012; Roos & Kaina, 2013.

1.2.3 Die DNA-Schadenserkennung: MRN-ATM-ATR-DNAPK - Abb. 1.4 A

Die DDR wird über sog. DNA-Schadenssensoren aktiviert. DSB werden durch den MRN-Komplex (Mre11-Rad50-NBS1), den 9-1-1 Komplex (Rad9-Rad1-Hus1) und CtIP erkannt (Gaziev & Shaikhaev, 2012; Parrilla-Castellar et al., 2004; Rupnik et al., 2010). Das Mre11-Protein besitzt eine Nuklease-Funktion, NBS1 ist für die Rekrutierung (Kerntransport) und Bindung u.a. von ATM zuständig und RAD 50 hält über sog. „Zink-Haken“-Domänen die Schwesterchromatiden zusammen (Kobayashi et al., 2004; Roset et al., 2014; Shibata et al., 2014). Dabei kommt es zum Entwinden und zur 5'-3' Resektion der DNA, wobei ein überhängendes 3'-Einzelstrangfragment gebildet wird (Christmann et al., 2003; Kastan & Bartek, 2004; You & Bailis, 2010). Der MRN-Komplex rekrutiert weitere Kinasen wie ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia related*), sowie die katalytische Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs - *catalytic subunit*) (Christmann et al., 2003; Hartley et al., 1995; Savitsky et al., 1995; Smith et al., 1999).

ATM ist die Hauptkinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) in der Erkennung und Signalweiterleitung von IR-induzierten DSB (Borde & Cobb, 2009; Kastan & Bartek, 2004). Eine Defizienz von ATM führt zur sog. Ataxia-Telangiectasia (A-T-Patienten). Diese Patienten zeigen erhöhte genomische Instabilitäten, die zu Neurodegeneration, Immundefizienz und Strahlensensitivität führen und weisen ein stark erhöhtes Risiko der Krebsentstehung auf (Shiloh, 2003). So ist ATM ein wichtiger Fokus der klinischen Forschung, vor allem im Zusammenhang von ATM-Mutationen und erhöhter Krebsinzidenz. ATM liegt als Dimer in der Zelle vor und dissoziiert nach Aktivierung über Autophosphorylierungsschritte an Serin (Ser) 1981 in aktive Monomere (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM-Monomere werden zusätzlich über Interaktion mit der C-terminalen NBS1-Untereinheit des MRN-Komplexes aktiviert (Borde & Cobb, 2009; Huertas, 2010). ATM phosphoryliert, unter anderem durch Interaktion mit den Proteinen des Mismatch-Reparatur-Systems MLH1 und MSH2, insbesondere CHK2 an Thr68 (Brown et al., 2003).

Im Gegensatz zu ATM wird ATR hauptsächlich nach replikativem Stress (Replikationsblock) aktiviert und phosphoryliert CHK1 an Ser345 (Cimprich & Cortez, 2008; Guo et al., 2000; Q. Liu et al., 2000; Smits et al., 2010). CHK2 und CHK1 phosphorylieren p53 an Ser20 (Shieh et al., 2000). Dies verhindert die Ubiquitinierung von p53 durch die E3-Ligase MDM2, wodurch p53 stabilisiert wird (Chehab et al., 2000; Chehab et al., 1999; Hirao et al., 2000; Unger et al., 1999). ATM und ATR können p53 auch direkt an Ser15 phosphorylieren, wobei die transkriptionelle Aktivität von p53 erhöht wird (Canman et al., 1998). Dadurch werden sowohl pro-apoptotische Signale (Fas-Rezeptor, Bax, PUMA, Noxa, Apaf-1, Pidd) als auch anti-apoptotische Signale (DDB2, XPC, FEN1, MGMT, MSH2) weitergeleitet (Christmann et al., 2007; Roos & Kaina, 2013). Phosphorylierung von p53 an Ser46 ist mit der Induktion eines pro-apoptotischen Ausgangs assoziiert (Oren, 2003). Ferner aktiviert p53 p21, welches den

CDK2-CyclinE-PCNA Komplex inhibiert und so zu einem G1/S-Zellzyklusblock führt (Christmann et al., 2003). Dieser G1/S-Zellzyklusblock wird auch p53-unabhängig über ATR-aktiviertes CHK1 verursacht. Dabei kommt es über CHK1 zu einer Phosphorylierung von Cdc25a an Ser123 und zur Ubiquitinierung und Degradation des Proteins. Folglich kann Cdc25a Cdk2-Cyclin E nicht über eine Dephosphorylierung an Thr14 und Tyr15 aktivieren. Außerdem phosphoryliert CHK1 Cdc25c an Ser216, welches anschließend an das 14-3-3 σ Gerüstprotein bindet und dadurch aus dem Zellkern geschleust wird. Cdk1-Cyclin B kann nicht mehr phosphoryliert werden und es entsteht ein G2/M-Arrest (Dalal et al., 1999).

ATM und ATR regulieren und aktivieren Wege der DNA-Reparatur. So phosphoryliert ATM NBS1, BRCA1 und c-Abl (Chen et al., 1999; Gatei et al., 2000; Lim et al., 2000; Shangary et al., 2000; Xu et al., 2002). c-Abl, welches auch durch DNA-PKcs aktiviert werden kann, ist dadurch in der Lage, das für die Homologe Rekombination essentielle Rad51 zu aktivieren oder über p73 den Zelltod auszulösen (Christmann et al., 2003). Die Phosphorylierung von NBS1 an Ser343 und Ser278 nach IR ist essentiell für die Rekrutierung des MRN Komplexes dargestellt als Foci an der DNA-Schadensstelle (Zhao et al., 2000). DSB aktivieren ATM-vermittelt den Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Phosphorylierung und Inaktivierung der inhibitorischen I κ B-Kinase (Li et al., 2001). Insgesamt aktivieren die Kinasen ATM und ATR sowie die katalytische Untereinheit DNA-PKcs mehr als 700 Proteine (Falck et al., 2005; Matsuoka et al., 2007), die einen Zellzyklusarrests, Zelltod oder die Induktion der DNA-Reparatur zur Folge haben.

Weitere wichtige Mediatoren der DNA-Reparatur, die durch ATM/ATR/DNA-PKcs an den DNA-Schaden rekrutiert und phosphoryliert werden, sind u.a. das Histon 2AX (γ H2AX = phosphorylierte Form), Artemis, 53BP1 (*p53 binding protein 1*) und MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Gaziev & Shaikhaev, 2012). Das Gerüstprotein MDC1 bindet an γ H2AX, stabilisiert aktiviertes ATM und den MRN-Komplex am DSB, wobei die Ubiquitinligase RNF8 rekrutiert wird und ein Komplex geformt wird, der RNF168, BRCA1 und 53BP1 im Bereich des DSB anlagert. MDC1 sowie γ H2AX agieren dabei als Vermittler der DDR und führen u.a. zur Auflockerung des Chromatins. Dadurch wird weiteren Faktoren der DDR der Zugriff auf die geschädigte DNA und somit eine Signalweiterleitung erleichtert (Cimprich & Cortez, 2008; Goldberg et al., 2003; Matsuoka et al., 2007; Smits et al., 2010; Stewart et al., 2003).

1.2.4 γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche

DNA-Doppelstrangbrüche und blockierte Replikationsgabeln aktivieren die DDR, die durch die Phosphorylierung des Histons 2AX (H2AX) gekennzeichnet ist. Die phosphorylierte Form wird γ H2AX genannt, da es nach Exposition mit γ -Strahlung, aber auch durch andere DNA-

schädigende Stoffe induziert wird (Ivashkevich et al., 2012). Das Chromatin ist in sog. Nukleosomen verpackt, wobei 150 Basenpaare der DNA 1,7-fach um 8 Histonmoleküle (2x H2A/H2B/H3/H4) gewickelt sind und 50 Basenpaare ein H1 Histon umwickeln (Muslimovic et al., 2012). H2AX liegt dabei je nach Zelltyp zu 2 – 25 % im Nukleosom vor (Kinner et al., 2008). Werden die PI3-Kinasen ATM, ATR und DNA-PK nach einem DNA Doppelstrangbruch aktiviert, so phosphorylieren sie H2AX in direkter Umgebung des DNA-Schadens an Ser139 (Ismail & Hendzel, 2008; Jackson, 2002; Rogakou et al., 1998). Dadurch wird das Chromatin aufgelockert bzw. umorganisiert, wodurch DNA-Reparaturenzyme effizienter die Schadensregion erreichen können (Chapman et al., 2012; van Attikum & Gasser, 2005). Somit führt γ H2AX zur Ballung von DNA-Reparaturmolekülen an den DSB (Kinner et al., 2008). γ H2AX führt zur Amplifizierung und Weiterleitung der DNA-Schadens-abhängigen G2/M-Checkpoint-Aktivierung, fördert die Artemis-abhängige Prozessierung von DSB und dient als Anker des Chromatins, um die Dissoziation des DSB zu verhindern. γ H2AX rekrutiert gleichzeitig Cohesin zur Stabilisierung des Chromatingerüsts zur Förderung der HR (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2004; Lowndes & Toh, 2005; Riballo et al., 2004; Rothkamm & Horn, 2009).

Nach IR und Genotoxinbehandlung akkumuliert γ H2AX im Bereich des DNA-Schadens und kann als intranukleärer Focus bzw. Foci (Mehrzahl) immunhistochemisch mit Erstantikörper gegen γ H2AX und einem mit Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper dargestellt werden (Nikolova et al., 2014). Andere Faktoren wie 53BP1, MRE11, RAD50, NBS1, MDC1 und RAD51 können auch als Foci dargestellt werden, wobei sie mit γ H2AX ko-lokalisieren können (Anderson et al., 2001; Dimitrova & de Lange, 2006; Furuta et al., 2003; Haaf et al., 1995; Stucki & Jackson, 2004). Die Foci können automatisiert oder per Auge am Mikroskop ausgezählt werden. Zudem können γ H2AX-positive Zellen am Durchflusszytometer bzw. über ELISA analysiert werden (Banath & Olive, 2003; Smart et al., 2011). Die Induktion von DSB führt zur schnellen (innerhalb von 1 - 3 Minuten nach IR) Formation von γ H2AX-Foci, wodurch 0,003 - 0,006 % der H2AX-Moleküle durch die o.g. PI-3 Kinasen an Ser139 phosphoryliert werden. Dieses Signal kann sich bis zu 2 bis 30 Megabasen vom Strangbruch entfernt ausweiten und betrifft ca. 2000 γ H2AX-Moleküle, die immunhistochemisch als ein Focus dargestellt werden (Muslimovic et al., 2012; Pilch et al., 2003; Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998; Sedelnikova et al., 2002). γ H2AX flankiert dabei den DNA Doppelstrangbruch. Ein Maximum der γ H2AX-Foci-Signale nach IR wird dabei je nach Zelle zwischen 30 min und 1 h erreicht (Berdelle et al., 2011; Muslimovic et al., 2012; Rogakou et al., 1999; Rogakou et al., 1998; Rothkamm & Horn, 2009; Sedelnikova et al., 2002).

Ein γ H2AX-Focus steht stellvertretend für einen DSB (Pilch et al., 2003; Rothkamm & Lobrich, 2003; Sedelnikova et al., 2002). γ H2AX-Foci können noch mehrere Stunden nach Schadensinduktion geformt werden und bis mehrere Monate in der Zelle als Stressantwort

persistieren (Bocker & Iliakis, 2006; Rodier et al., 2009). Die Abnahme des γ H2AX-Signals/Foci mit der Zeit ist assoziiert mit der Reparatur der DNA-Schäden. Fünf Phosphatasen sind für die Dephosphorylierung von γ H2AX verantwortlich; PP2A, PP4, PP6, PP2C und WIP1 (*wild-type-p53-induced phosphatase*) (Macurek et al., 2010; Moon et al., 2010; Muslimovic et al., 2012). So führt ein Knockdown von PP2A und PP6 zu persistierenden γ H2AX-Foci und zur ineffizienten DNA-Reparatur (Chowdhury et al., 2005; Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010). Die Bestimmung von γ H2AX-Foci ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung von Strahlen- oder genotoxischer Agenzien-induzierter DNA-Schäden und deren Reparatur, die in hohem Durchsatz automatisch und routinemäßig durchgeführt werden kann. Sie findet nach und nach Einzug in die klinische Anwendung im Bereich des individuellen Monitorings und der therapeutischen Dosisanpassung bei Krebspatienten während der Strahlen- oder Chemotherapie und wird zusätzlich als strahlenbiodosimetrische Bestimmung für Hochrisikogebiete (Kernkraftwerke, radioaktiv verseuchte Gebiete) diskutiert (Heylmann & Kaina, 2016; Ivashkevich et al., 2012; Zahnreich et al., 2015). So werden DNA-Schäden vor allem in peripheren Blutzellen als auch im Tumor selbst nachgewiesen, da eine Korrelation zwischen γ H2AX und der Einleitung des Zelltodes besteht (Banath & Olive, 2003; Muslimovic et al., 2009; Nikolova et al., 2014; Zahnreich et al., 2015). Dabei ist γ H2AX für Krebspatienten ein wichtiger biologischer Marker der Toxizität nach der Strahlen- bzw. Krebstherapie. Lymphozyten bieten sich insbesondere aufgrund ihrer einfachen Isolation durch die routinemäßige Blutentnahme für dosimetrische Bestimmungen an.

1.2.5 Reparatur der DSB durch die Nicht-homologe End-zu-Endverknüpfung (NHEJ) - Abb. 1.4 B

Es existieren zwei Hauptwege der Reparatur von DSB, die Nicht-homologe End-zu-Endverknüpfung (NHEJ - Abb.1.4 B) und die Homologe Rekombination (HR - Abb.1.4 C). Die NHEJ kann in allen Phasen des Zellzyklus, die HR nur in der S- oder G2-Phase stattfinden, da in diesen eine homologe Sequenz zum Abgleich des geschädigten DNA-Strangs zur Verfügung steht (Johnson & Jasin, 2000; Rothkamm et al., 2003; Takata et al., 1998). Die NHEJ benötigt zur Ligation beider Enden des DSB keine homologe Sequenz (Crichtlow & Jackson, 1998). Sie wird über das Holoenzym DNA-PK eingeleitet. Dabei bindet ein heterodimerer Komplex bestehend aus den Proteinen KU70 und KU80 an den DSB (Jeggo et al., 1992; Reeves & Sthoeger, 1989). Dadurch wird die geschädigte DNA vor dem Verdau durch Exonukleasen geschützt. Anschließend lagert sich DNA-PKcs an das KU-Heterodimer an und es bildet sich das Holoenzym DNA-PK (Gottlieb & Jackson, 1993; Hartley et al., 1995; Siple et al., 1995; Smith & Jackson, 1999). DNA-PKcs ist eine Ser/Thr-Kinase, die durch einzelsträngige DNA im Bereich des DSB aktiviert wird (Hammarsten, et al., 2000; Kim et al.,

1999). DNA-PKcs bindet an XRCC4, welches mit der Ligase IV einen Komplex bildet (Leber et al., 1998). Damit der XRCC4-Ligase IV Komplex die Enden der DNA innerhalb des DSB zusammenfügen kann, müssen diese prozessiert werden. Dies wird von der Endonuklease- und Helikase des MRN-Komplexes durchgeführt, die überschüssige DNA an 3'-Überhängen entfernt (Maser et al., 1997; Nelms et al., 1998; Paull & Gellert, 1999; Trujillo et al., 1998). Die Endonuklease FEN1 (*flap endonuclease 1*) entfernt dabei 5'-Überhänge (Christmann et al., 2003). Ein weiteres Protein zur Prozessierung der DNA-Überhänge ist Artemis mit einer 5' zu 3' Exonukleaseaktivität (Moshous et al., 2001). DNA-PKcs komplexiert und phosphoryliert Artemis, wodurch Artemis eine Endonukleaseaktivität erhält, die für die Entfernung von DNA-Einzelstrangüberhängen und Haarnadelstrukturen zuständig ist (Ma et al., 2001). Artemis ist somit in der Lage 5'- und 3'-DNA-Überhänge zu prozessieren.

Die NHEJ ist ein relativ einfacher Mechanismus der DSB Reparatur und daher ein sehr schneller Weg DSB aus dem Genom zu entfernen. So liegt die mittlere Zeit zur Prozessierung eines IR-induzierten DSB in Säugetierzellen zwischen 15 und 30 min (Dahm-Daphi & Dikomey, 1996; DiBiase et al., 2000; Rothkamm et al., 2003). Stärken der NHEJ sind ihre Schnelligkeit und Fähigkeit, in allen Zellzyklusphasen ohne homologe Sequenz funktionieren zu können. Die schnelle Ausführung der NHEJ als dominanter DSB-Reparaturweg verhindert dadurch das räumliche Abdriften der DNA-Enden, bevor diese wieder ligiert werden, und ein Zusammenfügen des DNA Bruchs mit anderen DNA Enden in unmittelbarer Umgebung. Sie wirkt so der Bildung chromosomaler Translokationen entgegen (Iliakis et al., 2004; Kinner et al., 2008; Mladenov & Iliakis, 2011; Schipler & Iliakis, 2013). Jedoch ist die NHEJ sehr fehleranfällig. Die hohe Geschwindigkeit wirkt chromosomalen Translokationen zwar entgegen, aber aufgrund der unspezifischen Ligation ohne homologe Sequenz können auch DSB-Enden zusammengefügt werden, die nicht zusammengehören, was letztenendes zu chromosomalen Translokationen führt (Iliakis et al., 2015). Weiterhin besitzt die NHEJ nicht die Fähigkeit prozessierte DNA Sequenzen im Bereich des Schadens durch Einbau von Nukleotiden wiederherzustellen. Dabei steigt das Risiko von Sequenzveränderungen in Form eines Verlusts von Nukleotiden und somit die Gefahr von Genmutationen und der Initiation der Karzinogenese (Iliakis et al., 2015).

1.2.6 Reparatur der DSB durch die Homologe Rekombination (HR) - Abb. 1.4 C

Während der HR wird das geschädigte Chromosom in der S- und G2-Phase mit einem unbeschädigten DNA-Molekül gleicher Sequenz als Vorlage zur Reparatur in Kontakt gebracht (Sonoda et al., 2001). Der DSB wird durch den MRN-Komplex in 5'- zu 3'-Richtung geschnitten. Es entstehen 3'-Überhänge, die durch einen Heptamerkomplex aus RAD52 gebunden werden, der die Enden vor exonukleolytischem Verdau schützt (Stasiak et al.,

2000). RAD52 konkurriert mit den KU-Proteinen um die Bindung am DSB, was für die Zelle dafür entscheidend sein kann, ob die NHEJ oder die HR eingeleitet wird (Van Dyck et al., 1999). RAD52 wechselwirkt mit RAD51 und RPA, was folglich den DNA-Strangaustausch aktiviert (Kagawa et al., 2001; New et al., 1998; Park et al., 1996; Reddy et al., 1997; Shen et al., 1996). RAD51 bildet dabei Filamente, stabilisiert SSB und DSB und fördert ATP-abhängig mittels RPA die Interaktion des homologen Strangs mit der geschädigten DNA (Benson et al., 1994; Sigurdsson et al., 2001). Dadurch wird der Austausch des DNA-Strangs ermöglicht, wobei ein Strang der geschädigten DNA in die ungeschädigte homologe DNA eindringt und einen sog. *D-Loop* bildet (Baumann & West, 1997; Gupta et al., 1998). Dabei wird der Aufbau des RAD51-Filaments durch weitere RAD51-Homologe wie RAD51B, C und D sowie XRCC2 und 3 unterstützt (Liu et al., 2002; Masson et al., 2001; Schild et al., 2000; Takata et al., 2000; Wiese et al., 2002). RPA spielt hierbei eine wichtige Rolle, indem es mit RAD51 interagiert und das Zusammenführen der DNA-Stränge stabilisiert (Eggler et al., 2002; Golub et al., 1998; Park et al., 1996). Nach erfolgter DNA-Synthese durch die Polymerasen Pol δ , ϵ und η werden die Enden ligiert und die entstandenen *Holliday Junctions* aufgelöst (Christmann et al., 2003; Maloisel et al., 2008). Diese Art der DSB-Reparatur führt zur Ligation der zueinander passenden DNA-Enden und zur Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Sequenz. Sie wirkt dabei der Bildung von chromosomalen Translokation entgegen und wird daher als fehlerfreier Weg beschrieben (Heyer et al., 2010; Iliakis et al., 2015; Manthey & Bailis, 2010; Moynahan & Jasin, 2010; Richardson et al., 1998). Nachteile der HR sind die Komplexität und somit Dauer der Reparatur des DNA-Schadens sowie ihre Limitierung auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus (Frankenberg-Schwager, 1980; Iliakis et al., 2015; Mladenov & Iliakis, 2011; Rothkamm et al., 2003).

Kurz sei noch ein dritter, alternativer Reparaturweg von DSB zu nennen: der alternative bzw. *Back-Up*-NHEJ-Reparaturweg (Iliakis et al., 2015). Dieser soll Zellen bei Ausfall der NHEJ und der HR noch die Möglichkeit geben, DSB zu reparieren. Dieser führt PARP-1-vermittelt zur direkten Ligation der Enden, wobei die Proteine DNA Ligase III, XRCC1, Histone H1m, die DNA Ligase I sowie die Proteine der DNA-Endenprozessierung CtIP und Mre11 involviert sind (Arakawa et al., 2012; Audebert et al., 2004; Bennardo et al., 2008; Dinkelmann et al., 2009; Iliakis et al., 2015; Liang et al., 2008; Mansour et al., 2010; K. Paul et al., 2013; Rosidi et al., 2008; H. Wang et al., 2005; Xie et al., 2009; Zhang & Jasin, 2011). Dieser Mechanismus der DSB-Reparatur ist weniger komplex als die konventionelle NHEJ. Er ist Substrat-unspezifisch, d.h. die Ligationen von DNA-Enden kann willkürlich auftreten. Es wird angenommen, dass der alternative Weg als eine Art *Backup* bzw. als letzten der Zelle noch verbleibenden Reserveweg in Kraft tritt. Der Ablauf der Reparatur verläuft sehr langsam und fördert die Entstehung chromosomaler Translokationen und somit auch die Gefahr der Karzinogenese (Boboila et al., 2010; Iliakis et al., 2015; Suto et al., 2015; Yan et al., 2007; Zhu et al., 2002).

PARP-1 ist eines von 17 Mitgliedern der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Familie und ein wichtiger Regulator der DNA-Reparatur (Ame et al., 2004; Hottiger et al., 2010). Diese Polymerasen modifizieren verschiedene Proteine durch Poly(ADP-Ribosyl)ation (Poly(ADP-Ribose) = PAR). Dieser Prozess verbraucht NAD⁺, wobei PAR-Polymere aus bis zu 200 Einheiten entstehen, die wiederum alle 50 Einheiten abzweigen können (sog. *Branching*) und einen dreidimensionalen Komplex formen (Burkle, 2001; Christmann et al., 2003; Gibson & Kraus, 2012; Lindahl et al., 1995). Dabei entsteht auch Nicotinamid. Nach DNA-Schadensinduktion durch IR oder alkylierenden Agenzien bindet PARP-1 spezifisch an SSB (Gradwohl et al., 1989; Menissier-de Murcia et al., 1989). Dabei wird PARP-1 auto-PARyliert, wodurch es mit vielfältigen Proteinen interagieren kann (Lindahl et al., 1995). So wechselwirkt es über PAR mit dem Basenexzisionsreparaturprotein XRCC1 und der DNA-Polymerase-β (Caldecott et al., 1996; Dantzer et al., 2000; Masson et al., 1998). Zusammen mit FEN1 aktiviert PARP-1 den sog. *long-patch* Weg der BER (Abb.1.4.D). Zugleich strukturiert PARP-1 das Chromatin um, damit DNA-Reparaturproteine den Bereich des DNA-Schadens besser erreichen können. Dies wird über eine Aktivierung des 20s Proteasoms vermittelt, das u.a. oxidierte Histone (insbesondere H1) degradiert (Mayer-Kuckuk et al., 1999; Ullrich et al., 1999). Viele Proteine der DNA-Schadensantwort weisen PAR-Bindestellen auf, z.B. p53, p21, DNA Ligase III, XRCC1, DNA-PKcs, KU70, NF-κB, Polε und die Caspase-aktivierte DNase (CAD). Somit kann PARP-1 ein breites Spektrum an Signalwegen im Bereich der DNA-Reparatur, der Zellzyklusregulation und des Zelltodes beeinflussen (Christmann et al., 2003; Pleschke et al., 2000). PARP-1 und dessen Inhibition ist ein wichtiger Angriffspunkt in der klinischen Forschung, überwiegend bei der Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber therapeutischen Agenzien (Davar et al., 2012; Rouleau et al., 2010).

1.2.7 Reparatur der Basenmodifikationen durch die Basenexzisionsreparatur (BER) - Abb. 1.4 D

Die BER entfernt geschädigte Basen der DNA. Diese können oxidierte (z.B. durch IR, ROS oder Entzündungsreaktionen) oder alkylierte Basen (z.B. durch das Chemotherapeutikum Temozolomid) sein. So repariert die BER u.a. das hoch mutagene 8-OxoGuanin, das mit Adenin fehlpaaren kann, sowie Thyminglykol und die nach Methylierung entstandenen N-Methylpurine sowie spontan entstandene apurine Stellen (Christmann et al., 2003; Roos & Kaina, 2013). Zuerst werden die modifizierten Basen durch DNA-Glykosylasen wie MPG, OGG1 oder APE1 erkannt und durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung entfernt (Scharer & Jiricny, 2001; Wilson & Barsky, 2001). In der sog. *short-patch* BER wird das 5'dRP von der Polβ über eine β-Eliminierung entfernt. Polβ fügt dabei das einzelne Nukleotid wieder in die DNA ein (Dianov et al., 1992; Matsumoto & Kim, 1995; Sobol et al., 1996; Wiebauer &

Jiricny, 1990). Die Ligation in der *short-patch* Reparatur wird über die Ligase III vermittelt, wobei diese mit dem Gerüstprotein XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein1*), Pol β und PARP-1 komplexiert (Kubota et al., 1996). Entstehen jedoch oxidierte oder reduzierte AP-Stellen sowie 3'-ungesättigte Aldehyde oder 3'-Phosphate, so können diese nicht über eine β -Eliminierung entfernt werden und die Reparatur findet über den *long-patch* Weg statt. Dabei ist Pol β noch in der Lage ein Nukleotid einzufügen (Podlutzky et al. 2001). Die Verlagerung des DNA-Strangs sowie die DNA-Synthese werden im Anschluss durch die Polymerasen Pol δ und Pol ϵ zusammen mit PCNA und RF-C durchgeführt. In diesem Prozess werden bis zu 10 Nukleotiden neu aufgefüllt und die überhängende Desoxyribose-Flap-Struktur (5'-dRPflap) durch PCNA-stimuliertes FEN1 entfernt (Klungland & Lindahl, 1997; Stucki et al., 1998). Die Ligation des Strangs erfolgt durch die Ligasen I und III mit Hilfe von PCNA und Pol β (Prasad et al., 1996; Srivastava et al., 1998; Tomkinson et al., 2001).

Es wurde gezeigt, dass Monozyten einen Defekt in der BER und NHEJ besitzen, da sie die Proteine XRCC1, Ligase III und DNA-PKcs sowie PARP-1 nicht exprimieren und somit gegenüber ROS und dem methylierenden Agens Temozolomid erhöhte Sensitivität zeigen. Makrophagen und Dendritische Zellen, die aus diesen Monozyten mithilfe der Zytokine GM-CSF bzw. IL-4 + GM-CSF ausgereift wurden, zeigten hingegen eine Expression dieser Proteine während des Ausreifeprozesses und eine gesteigerte Resistenz gegenüber diesen gentoxischen Noxen (Bauer et al., 2011; Bauer et al., 2012; Briegert & Kaina, 2007).

Im Zusammenhang mit der BER soll hier noch das Enzym MTH1 genannt werden. Dieses verhindert mittels Hydrolyse oxidierten Purine wie 8-Oxo-dGTP oder 8-Oxo-dGMP deren Einbau in die DNA und somit das Auftreten der toxischen und mutagenen Läsion 8-Oxo-Guanin im Strang (Furuichi et al., 1994; Sakumi et al., 1993). Inhibitoren von MTH1 stehen zurzeit klinisch stark im Fokus, da dieses Enzym in Tumorzellen eine erhöhte Aktivität aufweist. Tumorzellen bilden aufgrund ihres erhöhten Metabolismus und einer verringerten Redox-Regulation erhebliche Mengen an ROS, sodass MTH1 besonders in diesen Zellen eine Art Schutzfaktor ist. Eine Inhibition von MTH1 ist deshalb für eine Vielzahl an Tumorzellen hoch toxisch (Gad et al., 2014).

1.3 Zelltodwege nach DNA-Schaden

Nach einem DNA-Schaden reagieren Zellen mit komplexen Mechanismen, die das Schicksal der Zelle in eine bestimmte Richtung lenken. Dies kann zur Reparatur des Schadens und zum Überleben, oder auch zum Zelltod führen. Dieser Weg wird oft von Faktoren der DDR bestimmt, wobei es aber auch zur Toleranz des DNA-Schadens kommen kann. Diese Signalwege sind bestimmend, ob ein DNA-Schaden eine Krebsinitiation oder -progression

auslöst und sind von großer Bedeutung bei der Wirksamkeit von gentoxischen Noxen bei der Krebstherapie (Roos et al., 2016). So können DNA-Schäden Autophagie, Seneszenz und anti-apoptotische Faktoren wie Survivin, IAPs (*inhibitors of apoptosis*), XIAPs (*X-linked inhibitor of apoptosis proteins*) als auch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AKT die Einleitung des Zelltodes inhibieren, aber auch eine gezielte Induktion der Apoptose, Nekrose, Nekroptose oder der Pyroptose stattfinden (Bartek & Lukas, 2007; Roos et al., 2016; Vandenabeele et al., 2010). Im Folgenden werden einige dieser Wege kurz dargestellt:

1.3.1 Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird durch extrinsische Signale (Fas Rezeptor/CD95) und intrinsisch über den mitochondrialen Weg ausgelöst (Roos & Kaina, 2006). Der extrinsische Weg führt über die Aktivierung des Fas-Rezeptors (FasR) zur Anlagerung des DIS (*death-inducing signaling*)-Komplexes mit FADD (*Fas-associated protein with death domain*), welches die ausführenden Pro-Caspasen-8 und -10 aktiviert und eine Kaskade von Caspasen auslöst. Dies führt zum Verdau der DNA durch CAD und zur Inaktivierung von Proteinen durch die proteolytische Aktivität der Caspasen 3 und 7. Der mitochondriale Weg wird über die Freisetzung von Cytochrom c ausgelöst und über pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bak sowie anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L reguliert. Cytochrom c bildet mit der Pro-Caspase-9 und Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) das Apoptosom, welches eine Signalkaskade von ausführenden Caspasen aktiviert, die zur Spaltung von Proteinen und der DNA führt (Roos & Kaina, 2013). Apoptotische Zellen sind morphologisch gekennzeichnet durch zytoplasmatische und nukleäre Kondensation, Chromatinspaltung und der Bildung apoptotischer Körper, sowie der Umlagerung von Phosphatidylserinresten von der inneren zur äußeren Zellmembranseite. Da durch die Bildung Membran-gebundener zellulärer Fragmente (apoptotischer Körper) keine Zellinhalte nach außen gelangen, ist die Apoptose kein entzündungsauslösender Prozess (Fink & Cookson, 2005). Ein wichtiges Mitglied der IAPs ist das Survivin. Es inhibiert Caspasen, insbesondere die Caspase-3, und stimuliert gleichzeitig die Reparatur von DSB über Interaktion mit DNA-PK. Dies führt Survivin-vermittelt zur Hemmung der Apoptose und Stimulation der NHEJ, somit zum Schutz vor IR-induzierten DNA-Schäden. Vor allem in der Behandlung von Tumorzellen, die oft erhöhte Mengen an Survivin aufweisen, kann dies ein ernstes Problem in der Therapie darstellen (Altieri, 2003, 2008; Reichert et al., 2011).

1.3.2 Nekrose

Die Nekrose ist ein Caspase-unabhängiger Vorgang, der zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Anschwellen des Zytoplasmas und der Organellen, Zerstörung der Plasmamembran, Chromatinkondensation und nukleären Degradierung sowie der Aktivierung der Proteasen Calpain und Cathepsin führt. Das unkontrollierte Platzen der Zelle entlässt den Inhalt der Zelle ins Gewebe und löst Entzündungsreaktionen aus (Fink & Cookson, 2005; Golstein & Kroemer, 2007).

1.3.3 Autophagie

Die Autophagie ist ein regulierter Lysosomen-abhängiger Degradations- bzw. Recyclingprozess der Zelle. Dieser wird in drei Formen, die Chaperon-vermittelte Autophagie, die Mikro- und Makroautophagie, unterteilt (Boya et al., 2013). Dabei verschmelzen Lysosomen mit Autophagosomen zu sog. Autolysosomen, deren zytoplasmatischer Inhalt durch die lysosomalen, sauren Enzyme verdaut wird (De Duve & Wattiaux, 1966). Stimuli der Autophagie können Nährstofflimitierung oder zellulärer Stress (z.B. DNA-Schäden) sein. Autophagie führt zur Synthese, Abbau und Wiederverwertung zellulärer Komponenten. Autophagie (im Allgemeinen die Makroautophagie) wird über die Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) aktiviert, die den mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) Komplex1 hemmt und somit Autophagie auslöst (Sanli et al., 2014). Dabei wird ULK1 (*unc-51-like-kinase1*) und eine Kaskade weiterer ATGs (*autophagy related proteins*) aktiviert (Chan et al., 2007; Suzuki et al., 2001; Wang & Klionsky, 2003). ULK1 aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase der Klasse III, die einen großen Komplex mit Beclin-1, p105/Vsp15, UVRAG, ATG14 und Rubicon formt. Dadurch werden Membrane aus zytoplasmatischen Vesikeln zu sog. Phagophoren zusammengefügt und Bindestellen für weitere Autophagieproteine geschaffen. Die Bildung der Autophagosomen wird letztendlich durch ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme wie dem ATG12/ATG5-Komplex und dem modifizierten LC3-PE (*light chain 3 - phosphatidylethanolamine*) induziert (Kabeya et al., 2000; Rodriguez-Rocha et al., 2011; Weinberg & Ludwig; Yang et al., 2005). Die selektive Einlagerung und das Schließen des Autophagosoms um das zytoplasmatische Material wird über membraneingelagertes LC3 als auch über p62 vermittelt (Komatsu et al., 2007). Nach Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom entsteht ein Autolysosom, das die Bestandteile durch saure Enzyme lysiert und Aminosäuren wieder freigesetzt werden. Pharmakologische Inhibitoren der Autophagie sind u.a. Chloroquin und Bafilomycin, die eine Ansäuerung der Autolysosomen verhindern (Yamamoto et al., 1998). Autophagie dient dem Schutz der Zellen, auch von Krebszellen, kann aber auch mit einem Einleiten der Apoptose in Verbindung gebracht werden (Czarny et al., 2015; Kulkarni et al., 2016; Maiuri et al., 2007).

1.3.4 Seneszenz

DNA-Schäden können auch Seneszenz auslösen (von Zglinicki et al., 2005). Dabei kann ATM-vermittelt p53 und p16 aktiviert und eine Zellzyklusblockade induziert werden. Dies führt zum irreversiblen Verlust der Proliferationsfähigkeit und somit zur Seneszenz. Die Zellen bleiben dabei metabolisch aktiv (Gey & Seeger, 2013). Seneszenz charakterisiert sich demnach in Wachstumsstopp, Resistenz gegenüber Apoptose und einer stark veränderten Genexpression (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Sie reguliert Alterungsprozesse und die Entstehung von Krebs. So führt die Seneszenz im Alter zur Verringerung der Neurogenese, Hämatopoese und Pankreasfunktion (Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Molofsky et al., 2006). Seneszenz schützt wiederum vor der Entstehung von Krebs, da sich Krebszellen gerade wegen ihrer hohen Proliferationsrate von gesunden Zellen unterscheiden. Jedoch können seneszente Zellen aus ihrem Wachstumsblock (Verlust von p53- oder p16-Aktivität) entkommen und als gestresste, geschädigte Zellen mit unkontrollierter Proliferation das Risiko zur Entstehung entarteter Zellen erhöhen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Die Krebstherapie kann auch seneszente Krebszellen induzieren, wodurch eine Resistenz gegenüber weiteren Chemotherapeutika vermittelt werden kann (Lee et al., 2006). Wichtige Marker der Seneszenz sind die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β gal), sowie p16, p15, DEC1 (*differentiated embryo-chondrocyte expressed 1*) und DCR2 (*decoy receptor 2*) (Collado & Serrano, 2006; Dimri et al., 1995; Krishnamurthy et al., 2004).

1.3.5 Nekroptose

Die Nekroptose ist eine Form der regulierten Nekrose und ein Vermittler von Entzündungsreaktionen. Sie wird z.B. über den TNF-Rezeptor ausgelöst (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Dabei kann es zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod kommen, der über einen Komplex bestehend aus RIPK1 (*receptor interacting protein kinase-3*) und RIPK3, auch Nekrosom genannt, getriggert wird (Cho et al., 2009; S. He et al., 2009; Vandenabeele et al., 2010; Vercammen et al., 1998). Ein Substrat des Nekrosoms ist die MLKL (*mixed lineage kinase like*). Die letztendliche Ausführung der Nekroptose durch MLKL ist noch unklar. Es wird vermutet, dass MLKL Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran bildet oder direkt nach Phosphorylierung durch Konformationsänderungen Poren in der Membran bildet und dadurch einen nekroseartigen Zelltod auslöst (Cai et al., 2014; Chen et al., 2014; Su et al., 2014; Sun et al., 2012; J. Zhao et al., 2012). Ein pharmakologischer Inhibitor der Nekroptose ist Necrostatin, das RIPK1 hemmt (Degterev et al., 2008).

1.3.6 Parthanatos

Parthanatos ist eine weitere Form der regulierten Nekrose und ist eine über PARP vermittelte Form des Zelltodes. Daher der Name PAR (PAR-Polymer-vermittelt) und der Begriff Thanatos als griechische Personifikation des Todes (David et al., 2009). Durch DNA-Strangbrüche-aktiviertes PARP bildet PAR, welches die Translokation von AIF (*apoptosis inducing factor*) von den Mitochondrien in den Zellkern bewirkt. Dort kommt es über die Parthanatos AIF-assoziierte Nuklease (PAAN) zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Des Weiteren verbraucht aktives PARP-1 erhebliche Mengen an NAD⁺ und ATP, weshalb dieser Prozess aufgrund des hohen Energieverlustes in der Zelle auch zur Induktion des Zelltodes beiträgt (Fatokun et al., 2013).

1.3.7 Pyroptose

Die Pyroptose ist eine Form des programmierten Zelltods und wird über das sog. Inflammasom ausgelöst. Dabei kommt es zur Komplexbildung der Proteine ASC, NLR (*NOD-like receptor*) P3 und der ausführenden Pro-Caspase-1. Dies führt über die CARD (*caspase activation and recruitment domain*) von ASC zur Aktivierung der Caspase-1 und somit zur Spaltung des Caspase-1 Substrats Gasdermin D. Gasdermin D kann auch von der Caspase-11 geschnitten werden, die nach Bindung von zytosolischen, bakteriellen LPS aktiviert wird (He et al., 2015). Geschnittenes Gasdermin D formt Poren in der Membran und löst die Pyroptose aus (Liu et al., 2016). Diese ist gekennzeichnet durch ein Anschwellen der Zellen und der Ruptur der Plasmamembran, ähnlich der Nekrose (Fink & Cookson, 2005). Caspase-1 prozessiert auch die Vorläufer der entzündungsfördernden Zytokine IL-1 β und IL-18 zur aktiven Form, was zur Sekretion dieser Faktoren führt (Dinarello, 2009; Fantuzzi & Dinarello, 1999). Pyroptose wird u.a. durch bakterielle Pathogene (LPS) vor allem in Makrophagen und Dendritischen Zellen ausgelöst (Miao et al., 2010).

1.4 Weitere genotoxische Noxen

1.4.1 Cytolethal distending Toxin (CDT)

CDT ist ein bakterielles Toxin, das von einer Vielzahl gramnegativer Bakterien wie *Haemophilus ducreyi*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* oder *Campylobacter* spp. gebildet wird (Ahmed et al., 2001; Ceelen et al., 2006; Eyigor et al., 1999; Peres et al., 1997). CDT besteht aus drei Untereinheiten CdtA, CdtB und CdtC. Die drei Untereinheiten lagern sich als Holotoxin zusammen, wobei CDT sein toxisches Potential erhält (Pickett et al., 1994; Pickett et al., 1996; Sugai et al., 1998). Die Untereinheiten CdtA und CdtC sind für die Bindung des Holotoxins verantwortlich; CdtB agiert als toxisch aktive Untereinheit (Guerra et al., 2009;

Guerra et al., 2005). CdtA und CdtC binden mit ihren Lektin-Domänen und aromatischen Bereichen an Zelloberflächenmoleküle und entlassen die toxische Untereinheit CdtB in die Zielzelle (Hu et al., 2006; Nesic et al., 2004). Dies geschieht über eine Dynamin-abhängige Endozytose mit vesikulären Transport zum Golgi-Apparat (Cortes-Bratti et al., 2000; Cortes-Bratti et al., 2001; Golub et al., 1998). Über einen retrograden Transport zum endoplasmatischen Retikulum, gesteuert über N-gekoppelte Glykosylierungen, wird CtdB direkt in den Nukleus transloziert (Guerra et al., 2009). Dabei hilft ein N-terminales Kernlokalisierungssignal. CtdB lagert sich über eine DNA-Bindedomäne an die DNA an und induziert über seine DNase-I Aktivität und Phosphodiestererspaltungen SSB. Diese konvertieren zu DSB, wenn die Einschnitte direkt gegenüberliegen oder auf Replikationsgabeln treffen (Bezine et al., 2014; Fahrer et al., 2014; Fedor et al., 2013; Hassane et al., 2003; Nishikubo et al., 2003). CDT wird aufgrund der Eigenschaft DSB bilden zu können auch als Radiomimetikum beschrieben (Fahrer et al., 2014).

1.4.2 Temozolomid (TMZ)

TMZ ist ein monofunktionell methylierendes Agens. Dieses wird als Goldstandard hauptsächlich in der Therapie von Glioblastomen, einer sehr aggressiven und bisher unheilbaren Form des Hirntumors, aber auch bei Melanomen eingesetzt (Naumann et al., 2009; Yung et al., 1999). Dabei wird TMZ, z.T. nach operativer Entfernung des Tumors, zusammen mit Strahlentherapie (2 Gy Fraktionen pro Tag, 6 Wochen) appliziert. Dadurch kann das Überleben der Patienten von 12,1 Monate auf 14,6 Monate im Mittel verlängert werden (Stupp et al., 2005). TMZ wird nach oraler Aufnahme schnell absorbiert und hydrolysiert spontan in den aktiven Metaboliten 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC), das die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann (Abb. 1.5) (Hermisson et al., 2006; Kaina et al., 2007). Dort zerfällt es zu 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC) und dem hochreaktiven Methyldiazoniumion. Daraus spaltet sich Stickstoff ab und die freien Elektronenpaare der DNA-Basen reagieren mit dem Methylkation, wodurch sie über eine monomolekulare nukleophile Substitution methyliert werden.

Weitere monofunktionell methylierende Agenzien sind Procarbazin und Dacarbazin, die jedoch in der Leber über Cytochrome zum aktiv alkylierenden Diazomethan metabolisiert werden müssen (Aktories et al., Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie). Die DNA kann dabei an 13 Positionen methyliert werden. So werden zu 80 – 85 % N7-Methylguanin und 8 – 18 % N3-Methyladenin gebildet, die durch die BER repariert werden (O'Connor & Laval, 1991; Samson et al., 1991). Die toxischste Läsion ist dabei jedoch das O⁶-Methylguanin, welches nur 0,3 – 8 % der Methylierungen darstellt. O⁶-Methylguanin ist sehr stabil und wird durch die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) entfernt. Findet dieser

Reparaturmechanismus nicht statt, kann das O⁶-Methylguanin nach Durchlaufen von zwei Replikationsschritten Punktmutationen bilden, wobei im ersten Replikationsschritt O⁶-Methylguanin mit Thymin anstatt Cytosin paart (Roos et al., 2004; Warren et al., 2006). So wird in der nächsten S-Phase gegenüber Thymin Adenin eingebaut und die Punktmutation manifestiert sich. O⁶-Methylguanin paart erneut mit Thymin (Eadie et al. 1984). Des Weiteren wird die O⁶-Methylguanin-Thymin-Fehlpaarung durch die *Mismatch*-Reparatur (Basenfehlpaarungs-Reparatur) erkannt, wodurch aber über mehrere ineffektive *Mismatch*-Reparatur-Zyklen erneut Thymin eingebaut wird. Durch diese immer wiederkehrenden Reparaturversuche entstehen durch Exonuklease1-Aktivitäten Lücken bzw. Einschnitte im DNA-Strang, die durch ein Zusammenbrechen an der Replikationsgabel bzw. bei Überlappung mehrerer solcher DNA-Lücken zu DSB führen können (Caporali et al., 2004; Karran & Bignami, 1992; Ochs & Kaina, 2000; Quiros et al., 2010). Die *Mismatch*-Reparatur vermittelt folglich die zytotoxische Wirkung von TMZ in hohem Maße. Man versucht insbesondere Tumorzellen mit gezielten Strategien gegenüber Temozolomid zu sensibilisieren, indem u.a. MGMT durch O⁶-Benzylguanin gehemmt wird. Dabei stehen auch zelluläre Unterschiede von Reparaturmechanismen und die Expression von p53 im Fokus (Hermisson et al., 2006; Naumann et al., 2009). So konnten schon effektiv Melanomzellen durch Interferon- β und dem Histondeacetylaseinhibitor Valproinsäure, sowie Glioblastomzellen mittels des in der Malariatherapie eingesetzten Artesunats gegenüber Temozolomid sensitiviert werden (Berte et al., 2016; Roos et al., 2011).

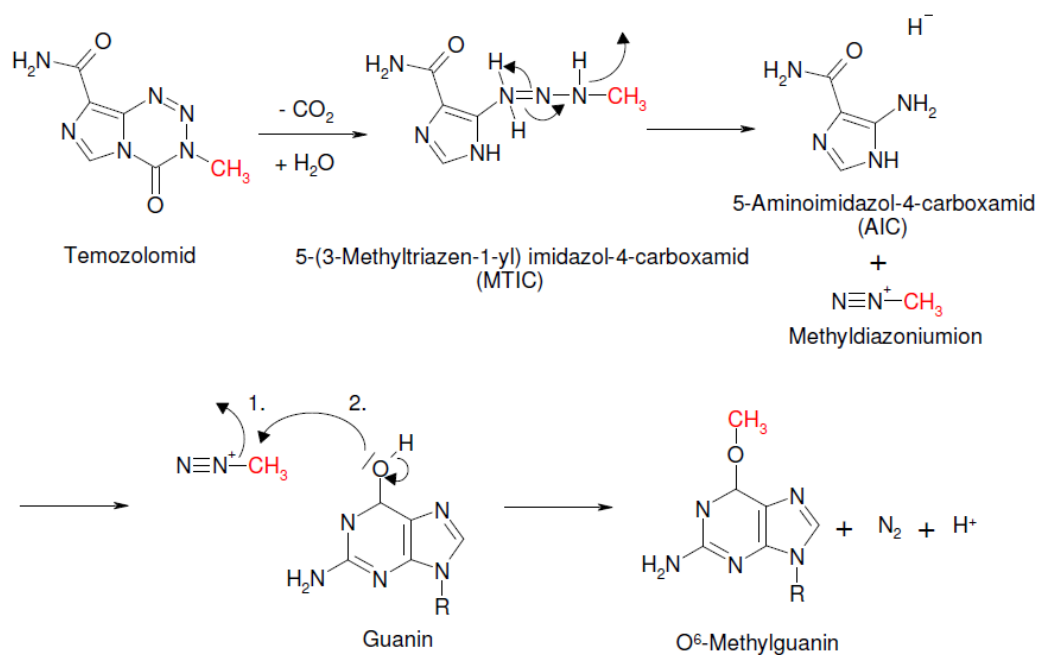


Abb. 1.5: Entstehung von O⁶-Methylguanin durch Temozolomid. TMZ wird über eine Hydrolyse zu MTIC unter Abspaltung von CO₂ umgewandelt. MTIC zerfällt zu AIC und dem hochreaktiven Methyldiazoniumium. Dieses methyliert über einen S_N1-Mechanismus und Abspaltung von Stickstoff Guanin, das mit dem freien Elektronenpaar am Sauerstoff mit dem Methylkation zu O⁶-Methylguanin reagiert. Adaptiert aus Kaina et al. 2007.

1.4.3 Mafosfamid, ein Derivat des Cyclophosphamids

Cyclophosphamid wird in der Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Hohe Dosen führen zur Immunsuppression, niedrige Dosen zur Immunstimulation (Emadi et al., 2009; Sharabi & Haran-Ghera, 2011). Die Mechanismen dahinter sind noch weitgehend unklar und werden zurzeit untersucht. Dabei ist es von besonderer Wichtigkeit zu verstehen, warum diese gegensätzlichen Effekte auftreten; denn eine Immunstimulation in der Krebstherapie ist erwünscht, eine Suppression aber ist unerwünscht. Dies gilt im umgekehrten Sinne für Autoimmunerkrankungen (Heylmann et al., 2013).

Cyclophosphamid wird durch Cytochrom P450 metabolisiert, wobei das 4-Hydroxycyclophosphamid entsteht. Dieses ist instabil und zerfällt zu dem aktiven Metabolit Phosphoramid-Mustard und Acrolein. Phosphoramid-Mustard bildet ein hochreaktives Aziridinium-Kation, welches mit der DNA an der N7-Position des Guanins reagiert und mit einem weiteren Guanin einen hoch toxischen *Interstrang-Crosslink* (ICL) bildet (Emadi et al., 2009; Joy et al., 2012). Die Reparatur solcher Crosslinks ist sehr komplex und setzt sich zusammen aus Mechanismen der Nukleotidexzisionsreparatur, Translesions-DNA-Synthese, HR und der Aktivität der sog. Fanconi-Proteine (Hashimoto et al., 2016). Mafosfamid ist ein Derivat von Cyclophosphamid, das spontan in 4-Hydroxycyclophosphamid hydrolysiert. Es benötigt somit keine metabolische Aktivierung und kann folglich für *in vitro* Experimente eingesetzt werden (Goldstein et al., 2008). Experimente im Mausmodell zeigten, dass Cyclophosphamid selektiv die Anzahl zirkulierender Treg depletiert und dadurch die Immunantwort erhöht (Ercolini et al., 2005; Lutsiak et al., 2005). So führte in Mäusen eine Behandlung mit niedrigen Dosen Cyclophosphamid zu einer Aktivitätsänderung antitumoraler NK-Zellen und DCs, wodurch sich der Verlauf eines multiplem Myeloms abschwächte (Sharabi & Haran-Ghera, 2011; Sharabi et al., 2010). Des Weiteren konnte Cyclophosphamid in Ratten die Effizienz einer Tumorstabilisierung gegen Kolonkrebs verbessern, indem Treg depletiert wurden (Ghiringhelli et al., 2004). In Phase II Studien konnte das Überleben von Patienten mit Nierenkrebs durch Cyclophosphamid und der dadurch generierten Reduktion von Treg das Überleben der Patienten nach Immuntherapie verlängern (Walter et al., 2012). Auch in Brustkrebspatienten konnten Treg selektiv durch Cyclophosphamid im peripheren Blut depletiert werden, was einherging mit einer verstärkten Expansion von CD4- und CD8-positiven Effektor T-Zellen (Ge et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Dosen an Cyclophosphamid mehr Zelltod in Treg im Vergleich zu CTL und Th auslöst und dies auf eine verminderte Reparatur von Cyclophosphamid-induzierten DNA-Schäden (ICLs) zurückzuführen ist (Heylmann et al., 2013). Weitere Verursacher von ICLs sind u.a. das Chemotherapeutikum ACNU (Nimustin) oder das zytotoxische Antibiotikum Mitomycin C (Li, Zhao, & Zhong, 2014; Weng et al., 2010).

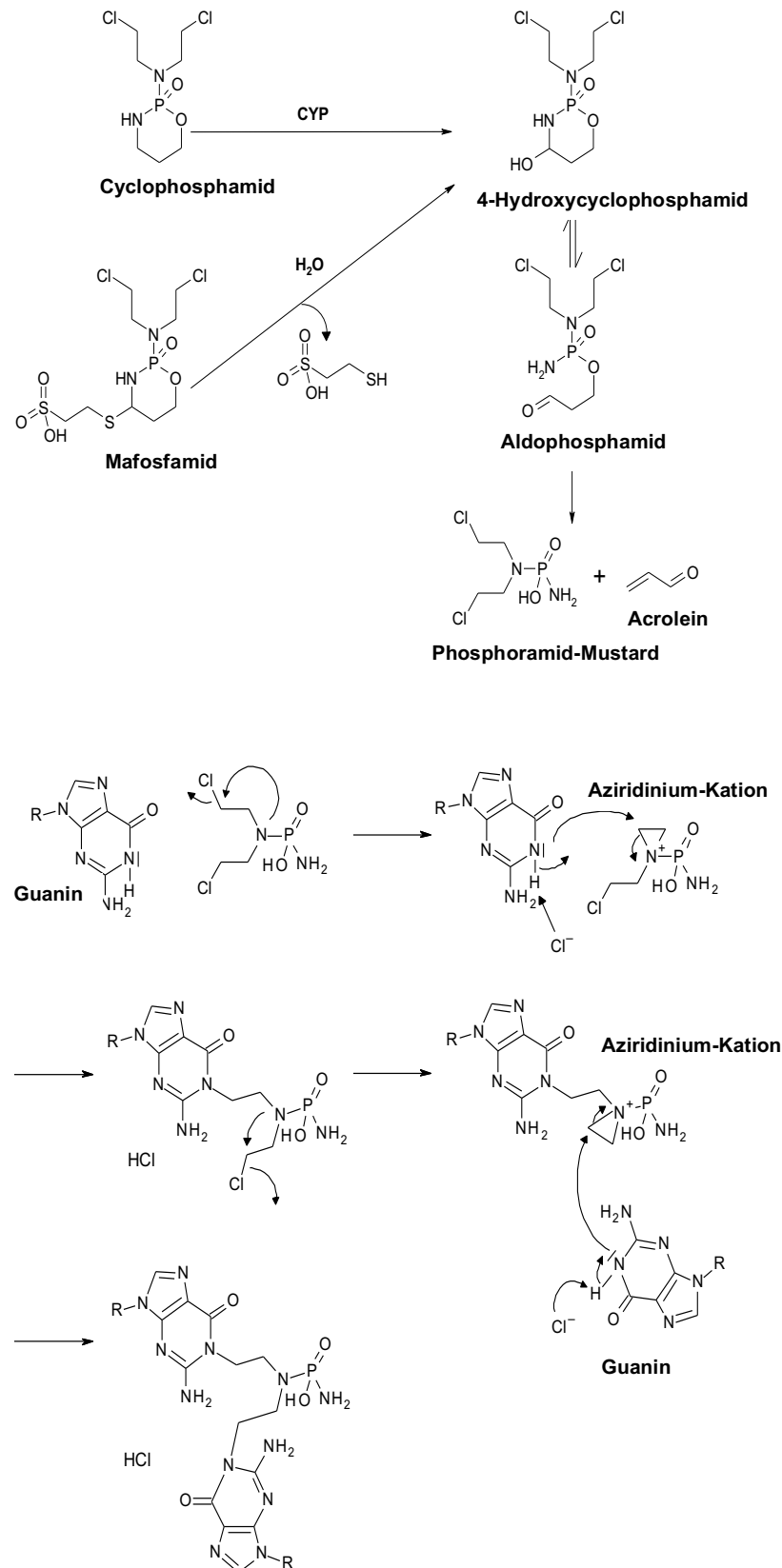


Abb. 1.6: Wirkungsweise von Cyclophosphamid bzw. Mafosfamid. Bildung der aktiven Form 4-Hydroxycyclophosphamid über CYP P450 Enzyme oder durch spontane Hydrolyse. 4-Hydroxycyclophosphamid zerfällt in den aktiven Metaboliten Phosphoramid-Mustard und Acrolein. Zwei Basen Guanin reagieren mit dem aus dem Phosphoramid-Mustard entstehenden, hochreaktiven Aziridinium-Kation. Es bildet sich ein *Interstrang Crosslink* in der DNA (Heylmann et al., 2013).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Strahlensensitivität unterschiedlicher humaner Blutzellpopulationen der lymphoiden und myeloiden Reihe anhand von Zelltodmessungen untersucht und verglichen werden. Darüber hinaus werden die IR-induzierten DNA-Schäden (in Form von γ H2AX) und deren Reparatur analysiert. DNA-Schäden in Immunzellen wurden dabei auch in Blutproben von Patienten mit Fokus auf T-Zellen und Monozyten während einer Ganzkörperbestrahlung bestimmt und gegenübergestellt.

In diesem Zusammenhang wurde die Blutropfenmethode (*Blood Drop Method*, kurz BDM) etabliert. Diese setzte die Fragestellung voraus, ob es möglich ist, nach einem minimal-invasiven Eingriff an der Fingerkuppe in nur einem Tropfen Blut DNA-Schäden in den darin enthaltenen Immunzellen qualitativ als auch quantitativ auswerten zu können.

Weiterhin soll untersucht werden, warum T-Zellen (PBLs bzw. auch in der Arbeit vereinfacht als Lymphozyten bezeichnet) einen hoch strahlensensitiven Phänotyp zeigen und ob und weshalb sie eine Strahlenprotektion erlangen, wenn diese über den CD3 T-Zellrezeptor und CD28 Ko-Rezeptor stimuliert werden, wie es der Situation einer Entzündung oder Immuntherapie entspricht. Dabei soll auch der Einfluss spezifischer, pharmakologischer Inhibitoren, u.a. von Faktoren der DDR, auf den strahleninduzierten Zelltod untersucht werden. Zudem wurde die Sensitivität unstimulierter vs. stimulierter Lymphozyten gegenüber dem bakteriellen Toxin und Radiomimetikum CDT bestimmt. Dies beschreibt mögliche Folgen einer systemischen, bakteriellen Infektion auf das Immunsystem des Wirts.

Weitere Untersuchungen mit dem Krebstherapie-relevanten Agens Temozolomid und dem immunmodulierenden Antikrebsmittel Cyclophosphamid (bzw. dem aktiven Derivat Mafosfamid) auf die Zelltodinduktion in unstimulierten als auch stimulierten Lymphozyten sowie auf spezifische T-Zellpopulationen wie Treg, Th und CTL sollen mögliche Auswirkungen einer Therapie auf das Immunsystem beschreiben. Insbesondere im Fall von Cyclophosphamid soll dessen spezifische Toxizität auf die unterschiedlichen T-Zellpopulationen untersucht werden und die Frage beantworten, weshalb hohe Dosen zu einer Immunsuppression, niedrige jedoch zu einer Immunstimulation führen.

Fragestellungen:

- Wie unterscheiden sich unterschiedliche humane Blutzellpopulationen in der Zelltodinduktion nach IR?
- Gibt es Unterschiede in der DNA-Reparatur von IR-induzierten DSB (γ H2AX)?
- Welche DNA-Schäden zeigen Monozyten und T-Zellen in Patienten, die einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt sind?
- Ist es möglich, DNA-Schäden in Blutzellen aus nur einem Tropfen Blut aus der Fingerspitze zu quantifizieren und welche Möglichkeiten für die Diagnostik ergeben sich daraus?
- Zeigen CD3-/CD28-stimulierte T-Zellen bzw. Zytokin-aktivierte CD34+ Vorläuferzellen unterschiedliche Strahlensensitivitäten als unstimulierte Zellen?
- Welche Signalwege werden in unstimulierten und stimulierten T-Zellen nach IR aktiviert und wie können diese durch pharmakologische Inhibitoren beeinflusst werden?
- Wie reagieren unstimulierte und stimulierte T-Zellen gegenüber CDT, Temozolomid und Mafosfamid?
- Welche Implikationen haben die unterschiedlichen Sensitivitäten der Blutzellpopulationen auf die Krebsmedikation bzw. welche Aussage kann man in Bezug auf Kombinationstherapien treffen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellmaterial

PBMCs und Granulozyten	- <i>Buffy Coat</i>: Leukozyten-reiches Plasma (Blutbank, gesunde Spender, Universitätsmedizin Mainz) - Vollblut von Leukämie-Patienten (PD Dr. Thomas Kindler, III. Medizinische Klinik)
Bluttropfenmethode	- Peripheres Blut aus der Fingerspitze (Prof. Dr. Bernd Kaina) - Schwanzvene/Herzpunktion C57BL/6 (Mäuse, 5 Wochen alt)
HCT 116	Zelllinie Humanes kolorektales Karzinom CCL-247, Labor PD Dr. Jörg Fahrer

2.1.2 Kits

CD3 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD56 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD19 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD34 <i>MicroBead Kit UltraPure</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8 <i>MicroBeads</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4 CD25 Regulatory <i>T Cell Isolation Kit</i> , human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
NucleoSpin RNA II Kit	Machery-Nagel, Düren
Verso cDNA Kit	ABgene, Hamburg
Sensi Mix SYBR + Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde
CYTO-ID® <i>Autophagy detection kit</i>	Enzo Life Sciences, New York, USA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Madison, USA
<i>Primer only geNorm 12 gene kit for use with SYBR Green</i>	Primerdesign, Chandler's Ford, UK

2.1.3 Antikörper

Durchflusszytometrie

anti-CD3-APC, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD3-PE, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD14-VioBlue, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD56-PE, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD19-PE, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD34-PE, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD4-VioBlue, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD4-FITC, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD8-APC, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-CD25-PE, mAK	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human CD95 eFluor®450, mAK	Affymetrix eBioscience, San Diego
Mouse IgG1 <i>Isotype Control</i> eFluor®450	Affymetrix eBioscience, San Diego

Immunhistochemie

anti-phospho S139 Histone γH2A.X, mAK aus Kaninchen, 81299, ChIP Grade	Abcam, Cambridge UK
anti-phospho S139 Histone γH2A.X, mAK aus Maus, JBW301	Merck Millipore, Darmstadt
anti-CD3, mAK aus Ratte, MCA 1477	AbD Serotec, Bio-Rad München
anti-CD14, mAK aus Maus, 63319	Abcam, Cambridge UK
anti-CD56, mAK aus Maus CA2693GA	AbD Serotec, Bio-Rad München
anti-CD19, mAK aus Maus, MCA2454	AbD Serotec, Bio-Rad München
anti-CD34, mAK aus Maus, 8536	Abcam, Cambridge UK
anti-CD15, mAK aus Maus, 555400	BD Pharmingen
anti-CD64, mAK aus Maus, 119843	Abcam, Cambridge UK
anti-phospho S1981 ATM, mAK aus Kaninchen, ab81292	Abcam, Cambridge UK
anti-phospho S824 KAP1,pAK aus Kaninchen, A300-767A-T	Bethyl laboratories, Montgomery, USA
anti-53BP1, mAK aus Maus, MAB3802	Merck Millipore, Darmstadt
anti-RPA, NA19C, Maus	Merck Millipore, Darmstadt
anti-AIF XP®, mAK aus Kaninchen	Cell Signaling, Massachusetts, USA
anti-PAR 10 H, mAK aus Maus	Labor Dr. Fahrner/Prof. Bürkle Konstanz

F(ab'2)-Ziege anti-Maus IgG (H+L) Zweitantikörper, Alexa Fluor®488 konjugiert, A11017	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
F(ab'2)-Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Zweitantikörper, Alexa Fluor®488 konjugiert, A11070	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Zweitantikörper, Cy3 konjugiert, 115 165 146	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgG (H+L) Zweitantikörper, Cy3 konjugiert, 112 165 143	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Western Blots	
anti-Caspase-3, pAK aus Kaninchen (35, 19, 17 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-7, pAK aus Kaninchen (35, 20 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-8, mAK aus Maus (57, 48, 18 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-9, pAK aus Kaninchen (47, 37, 35 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-2, mAK aus Maus (48, 14, 12 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-p53, mAK aus Maus (53 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-phospho Ser15 p53, pAK aus Kaninchen (53 kDa)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-phospho Ser46 p53, pAK aus Kaninchen (53 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-HIPK2, pAK aus Kaninchen (100 kDa)	Labor Dr. T. Hofmann, Heidelberg
anti-Gasdermin D, mAK aus Maus (53 kDa)	Abcam, Cambridge UK
anti-XRCC1, pAK aus Kaninchen (70 kDa)	Abcam, Cambridge UK
anti-DNA Ligase III, mAK aus Maus (103 kDa)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-PARP-1, c-II-10 mAK aus Maus (116, 89 kDa)	Labor Dr. Fahrner/Prof. Bürkle Konstanz
anti-ERK2 (42 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
konjugiert mit Infrarot-Farbstoff	
IgG Kaninchen IRDye 800CW	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Maus IRDye 800CW	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Kaninchen IRDye 680	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Maus IRDye 680	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Zellkultur T-Zell-Stimulation	
Purified NA/LE anti-human CD3 aus Maus, 555329	BD Pharmingen, Heidelberg
Purified NA/LE anti-human CD28 aus Maus, 555725	BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.4 Zellkulturmaterial

6/24/48/96-well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-well, Zellkulturschalen	Corning, Kaiserslautern
Accutase	Sigma-Aldrich, München
Ampuwa® H ₂ O	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
BD MicroFine Lanzetten, 0,3 mm	BD Biosciences, Heidelberg
Cellstar® Plastikpipetten 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
DMEM ohne Phenolrot	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS- Analyseröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen, SurPhob	Biozym, Hessisch Oldendorf
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrome AG, Berlin
Klebefolie, Microseal Sheet	Bio-Rad, München
Natrium-heparinisierte Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen	Marienfeld superior, Lauda Konigshofen
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare, München
Objektträger	Diagonal, Münster
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR Platten (96-Well)	Bio-Rad, München
Petrischalen 6cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
RPMI 1640 plus L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
StemMACS HSC Expansion Media XF, human, 130 100 473	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
StemMACS HSC-CFU Medium, human, 130 091 275	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Whatman Filterpapier	Roth, Karlsruhe
X-Vivo 15	Lonza, Basel, Schweiz
Zellkulturflaschen, Nunc EasYFlask 75cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.1.5 Zytokine

GM-CSF	Bayer, Leverkusen
G-CSF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SCF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>StemMACS HSC Expansion Cocktail</i> , human, 130 100 843	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.6 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40 (37,5 : 1)	
Agarose	Roth, Karlsruhe
Agarose low melting point (LMP)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Annexin V-FITC/APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Brilliant Blue G	Thermo Fisher Scientific, Waltham
CM-H ₂ DCFDA Stammlösung 40 mM in DMSO	Sigma Alderich, München
Dextransulfat-Natriumsalz	Sigma Alderich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque (Dichte 1,077 g/ml)	Sigma-Aldrich, München
Goat Normal Serum (Ziegenserum)	Invitrogen, Darmstadt
H ₂ O ₂	Sigma Alderich, München
Hepes	Sigma-Aldrich, München
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich, München
Ladepuffer (für SDS Page) RotiLoad1	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Optiprep (1,32 g/ml)	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Polymorphprep (1,113 g/ml)	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, München
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete, Mini EDTA-frei	Roche, Mannheim
Proteinmarker Spectra BR	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Proteinmarker Spectra HR	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tetramethylethylenylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TO-PRO-3	Invitrogen, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Eindeckmedium mit/ohne DAPI	Burlingame, USA

2.1.7 Zytostatika/Gentoxine

<i>Cytolethal distending Toxin</i> (CDT) (Stammlösung 400 ng/μl)	Bereitgestellt Labor Dr. Fahrner, aufgereinigt von Nina Seiwert
CDTmutiert (Stammlösung 400 ng/μl)	s.o.
Mafosfamid (Stammlösung 1 mg/ml)	ASTA Medica (Frankfurt, Germany),
Mitomycin C (Stammlösung 1 mg/1ml)	Sigma-Aldrich St- Louis, Germany
Nimustin (Stammlösung 8,8 mM)	Sigma-Aldrich St- Louis, Germany
Temozolomid (TMZ) (Stammlösung 35 mM)	Schering-Plough, USA

2.1.8 Inhibitoren

Akt1-Inhibitor A-674563 (Stammlösung 10 mM)	Selleckchem, München
ATM-Inhibitor KU-55933 (Stammlösung 10 mM)	Selleckchem, München
ATM-Inhibitor KU-60019 (Stammlösung 3mM)	Selleckchem, München
ATR-Inhibitor VE-822 (Stammlösung 10 mM)	Selleckchem, München
Caspase-2 Inhibitor Z-VDVAD-FMK (Stammlösung 2 mM)	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
Caspase-1/ICE Inhibitor Z-WEHD-FMK	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
CHK1-Inhibitor UCN-01 (Stammlösung 1mM)	Sigma-Aldrich St- Louis, Germany
CHK2-Inhibitor II (Stammlösung 10 mM)	Sigma-Aldrich St- Louis, Germany
Cyclic Pifithrin-alpha (Stammlösung 30 mM)	Biomol, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Dasatinib (Stammlösung 10 mM)	Selleckchem, München
DNA-PK-Inhibitor KU-0060648 (Stammlösung 0,9 mM)	Selleckchem, München
Mirin (Stammlösung 25 mM)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Necrostatin-1 (Stammlösung 50 mM)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Olaparib (Stammlösung 1 mM)	Absource Diagnostic, München
Pan Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (20 mM Stammlösung)	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
Survivin-Inhibitor III, LLP3 (Stammlösung 18,69 mM)	Merck Millipore, Darmstadt

2.1.9 Geräte

[137Cs]-Quelle Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Dänemark
Absaugpumpe Vacusafe	IBS Integra Biosciences, Fernwald

Autoklav VX-150	Systec, Wetterberg
Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Eppifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
FACS Canto II, Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Scanner, Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Inkubationsschrank, Hera Cell 150	Heraeus, München
Laser Scanning Mikroskop, LSM 710	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop TMS-F	Nikon, Düsseldorf
LS und MS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS <i>Multi Stand</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Medisense Stechhilfe	Abbott, Wiesbaden
Metafer <i>Imaging System</i>	Carl Zeiss, Oberkochen
Microplate Reader Sunrise RC	Tecan Trading AG, Schweiz
Midi/Mini MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop mit Phasenkontrast Axiovert 35	Carl Zeiss, Oberkochen
Nanodrop-ND- 1000-Spektrophotometer	FA. NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Neubauer- Zählkammer	Superior Marienfeld, Landau-Königshofen
pH-Meter, Typ pH525	WTW, Weilheim
Photometer, Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Pipetboy 2	Integra Biosciences, Landquart
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton
<i>Power Supply Model 200/2.0</i>	Bio-Rad, München
Probenschüttler, Unimax 2010	Heidolph, Schwabach
Real-Time System, CFX96	Bio-Rad, München
Röhrchen-Roller, MAC's MIX Tube Rolator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Spannungsquelle Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Sterilbank, MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Thermocycler, T Gradient	Biometra, Göttingen
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80°C)	Sanyo, München

TriStar2 Multimode Reader LB 942	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Ultraschallgerät, Sonifier Cell Disruptor 250	Branson Ultraschall, Diezenbach
Vakuumpumpe, VACUSAFE	Integra, Biebertal
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Wasserbad, JB Series	Grand Instruments Ltd., Cambridge, UK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, München

2.1.10 Puffer und Lösungen

10 % APS:	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml ddH ₂ O. aliquotieren, bei -20°C lagern
10 % SDS:	10 g SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) ad 100 ml ddH ₂ O
10 x TBS (pH 7,6):	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 g PFA in 10 ml PBS + 50 ml dH ₂ O mit NaOH- Plättchen lösen mit konz. HCl auf pH 7,4 einstellen ad 100 ml ddH ₂ O
5 x Lämmli-Stammlösungspuffer	30 g (0,25M) Tris 144 g (1,92 M) Glycin ad 1000 ml ddH ₂ O
6 % Dextran	0,3 g Dextran in 5 ml 0,85 %iger NaCl-Lösung
Agarose:	1,5 % (w/v) in ddH ₂ O, 37°C
Annexin-Bindepuffer (pH 7,4):	10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA
Bradford-Reagenz:	50 mg (0,01 %) Brilliant <i>blue</i> G 50 ml Phosphorsäure 85 % 25 ml EtOH (99,9 %) ad 500 ml ddH ₂ O. anschließend filtrieren und mit Alufolie bedeckt bei 4°C lagern
CM-H ₂ DCFDA (10/100 µM)	50 µg in 8,65/856 µl DMSO
DTT-Stammlösung (1 M)	154,25 mg ad 1 ml ddH ₂ O
Elektrophorese-Puffer (alkalischer <i>Comet</i>)	300 mM NaOH 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) pH ≥ 13

Elektrophorese-Puffer (neutraler <i>Comet</i>)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 7,5
LMP (engl. <i>low melting point</i>)-Agarose:	0,5 % (w/v) in dH ₂ O, 37°C
Lösung B	0,85 % (w/v) NaCl 1 mM EDTA 20 mM HEPES
Lysepuffer (alkalischer <i>Comet</i>)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1 % Na-Laurylsarcosinat 10 % DMSO 1 % Triton-X-100 pH 10
Lysepuffer (Gesamtzellextrakte, Western Blot)	50 mM Tris, pH 7,5 250 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % Triton-X-100
Lysepuffer (neutraler <i>Comet</i>)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1 % Na-Laurylsarcosinat 1 % Triton-X-100 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) pH 7,5
MACS Puffer:	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA pH 7,2 Miltenyi Protokolle
Na ₃ VO ₄ -Stammlösung (200 mM)	36,78 mg ad 1 ml ddH ₂ O
NaF-Stammlösung (500 mM)	20,95 mg ad 1 ml ddH ₂ O
Neutralisationspuffer (alkalischer und neutraler <i>Comet</i>)	0,4 M Tris pH 7,5
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,7 mM CaCl ₂ 6 mM MgCl ₂
PMSF-Stammlösung (200 mM)	34,84 mg ad 1 ml Isopropanol
Ponceau S	0,2 g (0,1 %) Ponceau S 200 ml 5 % Essigsäure
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/ ml in ddH ₂ O

Puffer F (alkalischer <i>Comet</i>)	40 mM HEPES 0,1 M KCl 0,5 mM EDTA 0,2 mg/ ml BSA pH 8,0
RIPA-Puffer	50 mM Tris pH8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 0,5 % Desoxycholsäure 0,1 % SDS 0,1 % Natriumazid 100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 200 mM Na ₃ VO ₄ 1 M DTT (Dithiothreitol) 1x Protease-Inhibitor
SDS-PAGE Laufpuffer	200 ml 5 x Lämmli-Puffer 10 ml 10 % SDS ad 100 ml ddH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgel (4 %)	4,4 ml ddH ₂ O 0,76 ml Tris-HCl (pH 6,8) 60 µl SDS 0,76 ml Acrylamid/Bis-acrylamid (AA/BA) (40 %) 60 µl APS (10 %) 6 µl TEMED
SDS-PAGE-Trenngel (10 / 12 %)	(5,7 / 5,1) ml ddH ₂ O 3 ml Tris-HCl (pH 8,8) 120 µl SDS (10 %) (3,0 / 3,6) mL AA/BA (40 %) 60 µl APS (10 %) 6 µl TEMED
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween-20
Transferpuffer (Western Blot)	100 ml 5 x Lämmli-Puffer 200 ml Methanol (insgesamt 20%) 10 ml 10 % SDS Ad 1000 ml ddH ₂ O

2.1.11 Software

<i>Accelrys Draw 4.1</i>	SP1 Accelrys, Inc., San Diego, USA
<i>BestKeeper Version 1</i>	http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html
<i>CFX Manager</i>	Bio-Rad, München
<i>Endnote X6</i>	Thomson Reuters, New York, USA
<i>FACSDiva Software 7.0</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Flowing Software 2.5.1</i>	www.flowingsoftware.com

<i>Graph Pad Prism 5/6</i>	Graph Pad Software, La Jolla, USA
<i>ImageJ</i>	https://imagej.nih.gov/ij/
Komet 4.20.2	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
<i>Microsoft Office 365</i>	https://www.microsoftstore.com/store/msde/de_DE/home
Odyssey 3.0	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Zen 2011	Carl Zeiss, Oberkochen

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation peripherer Blutzellen aus *Buffy Coat*

PBMCs: Als *Buffy Coat* bezeichnet man den leukozytenreichen Anteil, der nach der Aufarbeitung einer Vollblutspende abgetrennt wird, um reines Plasma und Erythrozytenkonzentrate für die Transfusionsmedizin zu erhalten. Die *Buffy Coats* stammten von gesunden Spendern aus der zentralen Blutbank der Universitätsmedizin Mainz. Um die weißen Blutzellen, die sog. Lymphozyten (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) mittels Dichtezentrifugation zu isolieren, wurde in einem 50 ml Greiner-Röhrchen 35 ml *Buffy Coat* mit 15 ml Ficoll bzw. Histopaque (ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml) unterschichtet. Im Anschluss wurde bei 2500 rpm für 35 min bei Rt (Raumtemperatur) ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Dichten der Blutzellen bildeten sich vier Schichten: Die obere Schicht bestehend aus dem Blutplasma, als Interphase ein weißer Ring bestehend aus PBMCs (hauptsächlich Monozyten und T-Zellen, weniger B- und NK-Zellen, wenige Granulozyten), darunter Ficoll bzw. Histopaque und eine Schicht am Boden bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten. Die obere Schicht des Plasmas wurde mit einer Pipette abgenommen und die darin enthaltenen Proteine (mitunter das Komplementsystem) bei 56 °C für 30 min inaktiviert. Nach zwei Zentrifugationsschritten von 4000 rpm, 5 min bei Rt wurde das gewonnene autologe Serum in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für die Zellkultur bei Rt aufbewahrt. Die PBMCs wurden mit einer 1 ml Pipette abgenommen und mit MACS Puffer gewaschen. Dabei wurden die Zellen 10 min 1x bei 1500 rpm, 1 x bei 1200 rpm und 2 x bei 900 rpm zentrifugiert und der Überstand nach jedem Waschschrift abgenommen, um die enthaltenen Thrombozyten zu entfernen.

10 µl der Suspension (Zellen aufgenommen in PBS oder X-VIVO 15) aus PBMCs bzw. isolierten Blutzellen wurde mit 10 µl Trypanblau vermischt und die Zellzahl pro ml in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden die gesunden Zellen (Trypanblau negativ) nach Zählen von Y Quadranten wie folgt berechnet:

Zellzahl (pro ml) = ((Anzahl der gezählten Zellen / Y) x 10 000) x 2

Die Zellen wurden entsprechend mit Medium verdünnt und ausgesät.

Granulozyten: Granulozyten müssen wegen ihrer hohen Dichte mit der sog. Optiprep-Lösung (Dichte 1,32 g/ml) isoliert werden. 9 ml *Buffy Coat* wurden mit 6 % Dextran Lösung in einem 15 ml Greiner-Röhrchen gemischt und das Gemisch 60 min bei Rt stehen gelassen. Es bildete sich ein klarer Überstand ohne Erythrozyten, das leukozytenreiche Plasma (LRP). Dieses wurde in einem neuen 15 ml Greiner-Röhrchen auf zwei Phasen überschichtet. Die unterste Phase 1 (4 ml) ist eine Mischung aus 17 Volumenanteilen (Vol) Optiprep und 43 Vol der Lösung B. Phase 1 hatte eine Dichte von 1,095 g/ml. Auf Phase 1 wurde Phase 2 (4 ml) überschichtet. Diese ist ein Gemisch aus 5 Vol Optiprep und 17 Vol Lösung B. Phase 2 hatte eine Dichte von 1,077 g/ml. Als oberste Schicht wurden 5 ml des LRP vorsichtig zugegeben. Das Greiner-Röhrchen wurde 30 min bei 1900 rpm ohne Bremse und bei Rt zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Leukozytenringe. Der obere Ring enthielt PBMCs, der untere Ring die Granulozyten. Die Suspension wurde bis zum 2. Ring abgesaugt bzw. das Serum und die PBMCs für weitere Versuche abgenommen. Der 2. Ring wurde in einem frischen 15 ml Greiner-Röhrchen gesammelt und mit MACS-Puffer aufgefüllt. Es wurde 1 x mit 1500 rpm, 1 x mit 1200 rpm und 1 x mit 900 rpm bei Rt zentrifugiert und der Überstand nach jedem Waschschritt abgenommen und das Tube wieder mit MACS-Puffer gefüllt. Die Zellen setzten sich in 75 cm² Nuncs Flaschen mit 1,5 % hitzeinaktiviertem Serum + RPMI1640 für 30 min im Inkubator auf den Flaschenboden ab. Danach wurden die nicht adhärennten Lymphozyten durch vorsichtiges Schwenken der Flasche abgesaugt und durch 2 x Waschen mit PBS entfernt. Die adhärennten Granulozyten lösten sich nach 1 bis 2 h in 10 % hitzeinaktiviertem Serum/RPMI ab.

2.2.2 Isolation peripherer Blutzellen (PBMCs und Granulozyten) aus Vollblut

Um PBMCs bzw. Granulozyten aus Vollblut (Patientenproben Kindler) zu isolieren, wurde die Lösung Polymorphprep verwendet. 5 ml Polymorphprep wurden mit 5 ml EDTA Vollblut in einem 15 ml Greiner-Röhrchen überschichtet. Die Probe wurde 30 min bei 1500 rpm bei Rt und ohne Bremse zentrifugiert. Im Röhrchen bildeten sich zwei weiße Ringe, der obere bestehend aus PBMCs, der untere aus Granulozyten. Die weitere Aufarbeitung ist in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

2.2.3 Aufreinigung von PBLs und Monozyten über Adhärenzschritte

Pro Well wurden 15×10^6 der in 2.2.1 aufgereinigten PBMCs in 6 Well-Platten von Corning in RPMI mit 1,5 % autologem Serum ausgesät und 30 min im Inkubator gelagert. Die

Suspensionszellen waren Lymphozyten (hauptsächlich T-Zellen), die adhären Zellen Monozyten. In einem zweiten Adhärenzschritt wurden die Suspensionszellen in eine 75 cm² Nunc Flasche überführt (pro Flasche 1 – 2 Wells der Corning-Platte) und für 1 h im Inkubator gelagert. Die Suspensionszellen waren aufgereinigte Lymphozyten, in dieser Arbeit auch PBLs (periphere Blutlymphozyten) genannt. Die auf den Corning-Platten adhären Monozyten wurden 3 x mit je 2 ml warmen PBS pro Well gewaschen. Pro Well wurde 2 - 3 ml RPMI (10 % autologes Serum) zugegeben, wodurch sich die Monozyten nach 1 – 2 h im Inkubator von der Schale lösten und geerntet werden konnten.

2.2.4 Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen und Dendritischen Zellen

Makrophagen: 700 000 Monozyten in 1 ml Medium wurden pro Well in einer 24 Wellplatte durch Zugabe von 800 U/ml GM-CSF (1 µl der Stammlösung von $0,8 \times 10^6$ U/ml pro 1 ml X-VIVO15) zu Makrophagen ausdifferenziert (alternativ: 1,5 Mio/ml in 3 ml X-VIVO15 + 3 µl GM-CSF pro Well einer 6 Wellplatte). Nach 6 Tagen wurden die abgerundeten Suspensionszellen im Überstand mit 1 – 2 x Waschen mit 37°C warmen PBS entfernt. Die adhären Zellen waren Makrophagen. Diese wurden mit Accutase-Lösung für 15 min bei 37° C abgelöst und geerntet oder für eine Behandlung mit 1 bzw. 3 ml frischem X-VIVO15 versetzt.

Dendritische Zellen: Die auf der Corning-Platte adhären Monozyten bzw. 2×10^6 abgelöste Monozyten in 3 ml X-VIVO15 (ausgesät pro Well einer 6 Wellplatte) wurden pro ml Medium mit 1 µl GM-CSF (Stammlösung $0,8 \times 10^6$ IU/ml) und 1 µl IL-4 (Stammlösung $0,5 \times 10^5$ IU/ml) versetzt und 3 Tage bei 37 °C im Inkubator gelagert. An Tag 3 wurden 900 µl altes Medium entfernt und mit 1 ml frischem X-VIVO15 Medium versetzt, das 1 µl IL-4 Stammlösung und 2 µl GM-CSF Stammlösung beinhaltet. Nach weiteren 3 Tagen (Tag 6) wurden 900 µl altes Medium entfernt und wiederum 1 ml frisches X-VIVO15 Medium mit 1 µl IL-4 Stammlösung und 2 µl GM-CSF Stammlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für weitere 2 Tage. An Tag 8 befanden sich die ausdifferenzierten Dendritischen Zellen (*immature* DCs) im Überstand und konnten mittels Pipette abgenommen werden.

2.2.5 Aufreinigung von Zellen aus PBMCs mit magnetischen Beads und Phänotypisierung am Durchflusszytometer

Es wurden spezielle *MicroBead* Kits der Firma Miltenyi benutzt, um aus PBMCs spezifische Populationen aufzureinigen. Das Prinzip besteht darin, Blutzellen mit magnetischen *Beads*-gekoppelten Antikörpern gegen typische CD Marker 15 bis 30 min zu markieren. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer versetzt und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert bzw.

gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und über eine Säule gegeben, die in einer magnetischen Halterung fixiert war. Je nach Menge der zu aufreinigenden Zellen wurden dabei LS- (maximal 2×10^9 Zellen, 10^8 markierte Zellen) oder MS (maximal 2×10^8 Zellen, 10^7 markierte Zellen) -Säulen verwendet. Die mit *Bead*-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen blieben im magnetischen Feld an der Säule haften. Nach mehreren Waschschritten mit MACS-Puffer wurde die Säule aus der Halterung genommen und die darin enthaltenen Zellen mit MACS-Puffer ausgespült und für weitere Experimente ausgesät. Die Schritte der Aufreinigungen sind im Detail in den Protokollen der Kits der Firma Miltenyi (Kapitel 2.1.2) beschrieben und variieren leicht von Zelltyp zu Zelltyp. Speziell für regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) wurden zuerst alle nicht CD4-positiven Zelltypen mit Biotin-konjugierter AK markiert und über *Bead-gekoppelter* AK gegen Biotin entfernt. In einem zweiten Schritt wurden aus der CD4-positiven Fraktion mittels *Bead-gekoppelter* AK gegen CD25 regulatorische T-Zellen isoliert.

In der Durchflusszytometrie, nach der Firma Becton Dickinson auch „*Fluorescence-Activated Cell Sorting*“ (FACS) genannt, passieren einzelne Zellen, die in Suspension in einem dünnen Probenstrahl fokussiert sind, einen Laserstrahl-beleuchteten Messbereich. Dort entsteht ein Streulicht und je nach Markierung/Beladung der Zelle mit Fluoreszenz-gekoppelten AK kommt es zur Lichtemission, wobei verschiedene Eigenschaften/Phänotypen der Zelle detektiert werden können. Ein Detektor ermittelt über das Vorwärtstreulicht, auch *forward scatter* (FSC) genannt, die Zellgröße. Das sog. Seitwärtstreulicht, den *sideward scatter* (SSC), beschreibt das Streulicht und gibt die Granularität der Zellen an. Ist die Zelle mit Fluorochromgekoppelten-AK markiert, so können diese über den Laser angeregt werden und das Emissionslicht über bestimmte Kanäle und Detektoren aufgefangen werden.

$0,5$ bis $2,5 \times 10^5$ Zellen pro $100 \mu\text{l}$ PBS wurden mit je $1 - 2,5 \mu\text{l}$ Fluorochrom-gekoppelter Antikörper für 20 min bei Rt und im Dunkeln gegen CD56 (PE), CD3 (APC/PE), CD19 (PE), CD14 (*VioBlue*), CD34 (PE), CD4 (FITC, *VioBlue*), CD25 (PE), CD8 (APC) bzw. gegen den CD95/FasR (eFluor450®) inkubiert (im Anhang Abb. 6.1-3, 6.5, 6.10). Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 7 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in $250 - 450 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Färbungen in Kombination mit unterschiedlichen Fluorochromen waren z.T. ohne Kompensation möglich (PE + APC, PE + APC + *VioBlue*) bzw. musste bei Kombinationen von PE + FITC am Durchflusszytometer kompensiert werden. Eine Kompensation ist dann notwendig, wenn ein Farbstoff Fluoreszenzsignale emittiert, die auch im Kanal des anderen Fluoreszenzfarbstoffes Signale verursachen. Kompensationseinstellungen erfolgten über die FACSDiva-Software nach zusätzlichen Einzelmessungen der Fluoreszenzsignale, sodass z.B. auch PE + FITC Kombinationen gemessen werden konnten. Zellen, die positiv für ein Fluorchrom sind,

verschieben sich in sog. Dot Blots oder Histogrammen entlang der Achse des entsprechenden Kanals/Signals.

Im Folgenden wird die Effizienz bzw. Ausbeute der Aufreinigung beschrieben, d.h. wieviel einer spezifischen Zellpopulation aus PBMCs isoliert werden können. Dies schwankte von Probe zu Probe. Pro Beutel *Buffy Coat* konnten per Ficoll-Dichtezentrifugation zwischen 4×10^8 und 1×10^9 PBMCs isoliert werden. Beispiele einer *Bead*-Isolation mit den entsprechenden Zellausbeuten aus PBMCs sind im Folgenden dargestellt:

Ausbeute nach <i>Bead</i>-Isolation aus 200×10^6 PBMCs	(CD+) Zelltyp
80×10^6	CD3+ T-Zellen
31×10^6	CD4+ Th
30×10^6	CD14+ Monozyten
25×10^6	CD8+ CTL
16×10^6	CD56+ NK-Zellen
$3,5 \times 10^6$	CD19+ B-Zellen
$1,3 \times 10^6$	CD4+ CD25+ Treg
$0,21 \times 10^6$	CD34+ Vorläuferzellen

Hierbei ist zu beachten, dass vor allem CD34+ Vorläuferzellen, Treg, sowie B-Zellen in sehr geringer Anzahl in den aus *Buffy Coat* isolierten PBMCs vorhanden sind.

2.2.6 Übersicht der verwendeten Blutzelltypen

Für das bessere Verständnis der nachfolgenden Ergebnisse und Diskussion werden hier nochmals alle verwendeten Blutzelltypen dargestellt und benannt:

<u>Zelltyp</u>	<u>Aufreinigung/Markierung</u>	<u>Zusammensetzung/Abkürzung</u>
Periphere Mononukleäre Blutzellen	weißer Ring nach Ficoll-Dichtezentrifugation	PBMCs: T-Lymphozyten, Monozyten, wenig Granulozyten, wenig B- und NK-Zellen, sehr wenig CD34+ Vorläuferzellen
Periphere Blut Lymphozyten	nach Absetzen von Monozyten aus PBMCs im Überstand	PBLs: > 70 % T-Lymphozyten in dieser Arbeit auch vereinfacht als Lymphozyten beschrieben
Granulozyten	nach Optiprep/Polymorphprep-Dichtezentrifugation; CD15 oder CD64 markiert (LSM)	hauptsächlich neutrophile Granulozyten
Monozyten	nach Adhärenz von PBMCs; CD14+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs	Mo
Makrophagen	Ausdifferenzierung aus Monozyten mit GM-CSF	Mph
Dendritische Zellen	Ausdifferenzierung aus Monozyten mit GM-CSF und IL-4	DCs (immature DCs)
T-Zellen	CD3+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs, CD3 markiert (LSM)	T-Zelle (PBLs)
T-Helferzellen	CD4+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs, CD3 und CD4 markiert (Durchflusszytometer)	Th
Zytotoxische T-Zellen	CD8+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs, CD3 und CD8 markiert (Durchflusszytometer)	CTL
Regulatorische T-Zellen	CD25+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs nach Depletion CD4-negativer Zellen	Treg
Natürliche Killerzellen	CD56+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs; CD56 markiert (LSM)	NK
B-Zellen	CD19+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs; CD19 markiert (LSM)	B
Vorläuferzellen	CD34+ <i>Bead</i> -Isolation aus PBMCs	CD34+ Vorläuferzellen

2.2.7 Kultivieren der Zellen

Je nach Versuch und Zelltyp wurden $0,2 - 1 \times 10^6$ Zellen pro ml X-VIVO15 ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Die Kultivierung erfolgte meist in 24 oder 6 Wellplatten. Aufgrund der geringen Ausbeute an CD34+ wurden $0,5 - 1 \times 10^5$ Vorläuferzellen in 0,2 - 0,5 ml X-VIVO15 ausgesät.

Suspensionszellen wurden von der Platte abpipettiert bzw. mit PBS vom Well gewaschen. Adhärenente Zellen (Mo, Mph) wurden mit Accutase-Lösung für 15 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit PBS von der Platte gewaschen. Durch Zentrifugation- und Waschschritten (mit PBS oder Medium) wurde die Accutase-Lösung entfernt und die Zellen in frischem Medium ausgesät.

2.2.8 Stimulation von PBLs bzw. T-Zellen

Ein Well einer 24-Wellplatte wurde mit 4 µl anti-CD3 (AK gegen CD3) in 200 µl 0,1 M NaHCO₃ Lösung (pH 8,2, steril filtriert) für 1 - 2 h im Inkubator beschichtet (*gecoatet*). Die Lösung wurde vorsichtig abgesaugt und mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde je Well $0,5 - 1 \times 10^6$ PBLs in 1 ml X-VIVO15 + 10 % autologem Serum und 2 µl anti-CD28 (AK gegen CD28) ausgesät. Unstimulierte Zellen wurden jeweils ohne CD3/CD28 Antikörper für 2 Tage kultiviert. Nach 2 Tagen im Inkubator wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und in X-VIVO15 für Experimente ausgesät (unstim vs. stim Lymphozyten/PBLs).

2.2.9 Stimulation CD34+ Vorläuferzellen und CFU-Assay

Stimulation: 5 000 - 10 000 aufgereinigte CD34+ Vorläuferzellen wurden in *Stem MACS HSC Expansion Medium XF*, in welchem der Stem MACS HSC Expansion Cocktail (Flt-3 Ligand, SCF, TPO) 1:100 verdünnt wurde, in 48 Well Platten ausgesät und für 6 Tage bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden danach für die Bestrahlung geerntet und für AnnexinV-Bestimmungen neu ausgesät. Unstimulierte CD34+ Zellen mussten direkt am Tag der Isolation bestrahlt werden, da sie ohne Expansionscocktail keine 6 Tage in Kultur überleben.

CFU-Assay: HSC-CFU *Basic* Methylzellulose Medium wurde mit IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF (Endkonz. 20 ng/ml) und SCF (Endkonz. 50 ng/ml) versetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das fertige Medium wurde einen Tag vor Benutzung ü.N. im Kühlschrank aufgetaut, danach gut geschüttelt und 10 min stehen gelassen, um Luftblasen entweichen zu lassen. 10 000 aufgereinigte CD34+ Vorläuferzellen wurden in 0,3 ml IMDM + 2 % FCS aufgenommen und mit 3 ml des fertigen HSC-Mediums in ein 15 ml Greiner-Röhrchen gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde es 10 min bei Rt stehen gelassen und je 1,1 ml in 3,5 cm Kulturschalen ausgesät. Je zwei Schalen wurde in eine 10 cm Schale gelagert, eine weitere 3,5 cm mit

ddH₂O und offenen Deckel dazugestellt und die 10 cm Schale mit geschlossenem Deckel 14 - 16 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Kolonien wurden am inversen Mikroskop mit Phasenkontrast Axiovert 35 (Carl Zeiss) aufgenommen, die Kolonien anhand des beiliegenden Miltenyi Protokolls zu *StemMACS HSC-CFU Media* und mithilfe des Technischen Services von Miltenyi bestimmt. Die Kolonien sind in Abb.1.1 dargestellt.

2.2.10 Exposition der Zellen mit ionisierender Strahlung

Die Zellen wurden in 15 oder 50 ml Greiner-Röhrchen ($0,2 - 1 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium) in einem *Gammacell Irradiator 2000* (Cäsium-Quelle) bestrahlt und danach direkt für Experimente ausgesät bzw. für Kinetikstudien im Inkubator bis zum jeweiligen Zeitpunkt gelagert. Die Bestrahlungszeiten mit der äquivalenten Dosis sind unten dargestellt:

Dosis in Gy	Bestrahlungszeit in sek
0,125	2
0,25	5
0,5	10
1	21
2	43
5	105

2.2.11 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren und gentoxischen Agenzien

Die Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe des Stoffes mit einer bestimmten Stammlösungskonzentration direkt in das Medium, um die erwünschte Endkonzentration zu erhalten. Bei Mengen unterhalb 0,5 µl wurde eine Verdünnung des Stoffes in PBS bzw. Medium angesetzt. Inhibitoren wurden jeweils 1 h vor Behandlung des Genotoxins bzw. Bestrahlung mit IR dem Medium zugegeben.

2.2.12 Mausexperimente für die BDM

5 Wochen alte C57 BL/6 Mäuse wurden intraperitoneal mit 200 mg/kg Temozolomid (gelöst in DMSO), die Kontrollmaus mit DMSO behandelt. Das Blut wurde über eine Herzpunktion entnommen. Im Falle der *ex-vivo* Bestrahlung wurde das Blut aus der Schwanzvene in Glaskapillarröhrchen überführt, diese in Greiner-Röhrchen gestellt und im *Gammacell Irradiator*

bestrahlt. Die Experimente wurden nach den Vorschriften und Richtlinien des Ethik-Komitees von Rheinland-Pfalz durchgeführt und die experimentellen Protokolle von dem institutionellen Ausschuss genehmigt.

2.2.13 Messung des Zelltodes am Durchflusszytometer mit AnnexinV/PI

Die Zellen ($0,1 - 2 \times 10^6$) wurden geerntet und in 15 ml Greiner-Röhrchen 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 25 μ l 1 x AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert. 1,25 μ l AnnexinV-FITC oder -APC wurde hinzugegeben, vorsichtig resuspendiert, die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 20 min bei Rt im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 220 μ l PBS + 5 μ l PI (Stammlösung 50 μ g/ml) hinzugegeben und die Zellen auf Eis gestellt. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (FACSDiva-Software und Auswertung über *Flowing Software 2*). Das *Gating* erfolgte nach Abb. 6.8. (im Anhang). Fluorochrom-gekoppeltes AnnexinV kann an Phosphatidylreste binden, die während der frühen Apoptose an die Außenseite der Zellmembran wandern. PI kann durch geschädigte Zellmembranen in das Innere der Zelle gelangen und dort in die DNA interkalieren. Mittels PI können spät apoptotische Zellen und nekrotische Zellen detektiert werden, sowie die Zellzyklusphase bestimmt werden. Man unterscheidet die unterschiedlichen Zelltodphasen wie folgt: PI-negative/AnnexinV-negative Zellen sind lebendig, PI-negative/AnnexinV-positive Zellen früh apoptotisch und PI-positive/AnnexinV-positive Zellen nekrotisch bzw. spät apoptotisch.

Die AnnexinV-Färbung kann auch in Kombination mit einer CD-Markierung von Blutzellen erfolgen, wobei hier mögliche Kompensationsschritte der Fluorochrome beachtet werden müssen. Hier erfolgte nach dem Ernten der Zellen zuerst die CD-Markierung in PBS (20 min bei Rt) und nach einem weiteren Waschschrift mit PBS die AnnexinV-Färbung in AnnexinV-Bindepuffer. Aufgrund des breiten Emissionsspektrums von PI, welches auch in andere Kanäle detektiert werden kann, wurde in einigen Versuchen auf eine zusätzliche PI-Färbung verzichtet. Vorausgegangene Analysen zeigten nach Exposition mit IR kaum eine Induktion der Nekrose und somit keine Notwendigkeit einer zusätzlichen PI-Färbung.

Berechnung des induzierten Zelltodes: Die meisten hier gezeigten Ergebnisse zeigen den durch ein Agens oder Bestrahlung induzierten Zelltod. Dieser berechnet sich aus dem Wert der Agenzien- oder IR-behandelten Probe minus dem (basalen) Wert der unbehandelten Probe. Im Falle einer Vorbehandlung mit einem Inhibitor wurde der Wert der Inhibitor-Behandlung von dem Wert der Inhibitor + Gentox-Behandlung subtrahiert. So kann jeweils der Effekt des Inhibitors auf die Gentox-Behandlung dargestellt werden.

Signifikanzen wurden mit *Graph Pad Prism* berechnet und wurden je nach Versuch zwischen einzelnen Populationen oder im Vergleich unstimulierte vs. stimulierte Population dargestellt. In den AnnexinV/PI-Graphen werden die Signifikanzen bzgl. der Apoptose über Verbindungslinien dargestellt bzw. geben Sterne über den schwarzen Balken signifikante Unterschiede in der Apoptose, Sterne über weiße Balken Signifikanzen in der Nekrose wieder.

2.2.14 Bestimmung der SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer

PI kann durch eine zerstörte Zellmembran in die Zelle eindringen und dort in die DNA interkalieren. Das ermöglicht die Bestimmung unterschiedlicher Zellzyklusphasen, da das PI-Signal proportional zum DNA-Gehalt ist (G0/G1-Phase, einfaches Signal aufgrund eines vollständigen Chromosomensatzes; S-Phase, Signal verdoppelt sich aufgrund der Replikation der DNA; G2-Phase, doppelter Chromosomensatz). Dabei kann auch die sog. SubG1-Fraktion ermittelt werden. Diese beschreibt die durch apoptotische Prozesse fragmentierte DNA der Zellen, die sich unterhalb des G1-Signales befindet.

Das Zellpellet wurde unter Vortexen mit 2 ml eiskalten 80 %igem Ethanol versetzt und für 1 h bis maximal 2 Wochen bei -20 °C gelagert. Nach dieser Fixierung der Zellen bzw. Aufschließen der Zellmembran wurden die Zellen 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 333 µl PBS resuspendiert und 1 µl RNase (Stammlösung 10 mg/ml) zugegeben. Diese baut RNA ab, sodass PI nicht mehr daran binden kann und nur DNA anfärbt. Nach 1 h bei Rt wurden 164 µl PI (Stammlösung 50 µg/ml) zugegeben, kurz gevortext und die Proben im Dunkeln auf Eis bis zur Messung am Durchflusszytometer gelagert. Das PI Signal wurde in einem Histogramm dargestellt und die SubG1-Fraktion mittels FACSDiva-Software oder *Flowing-Software2* ausgewertet.

2.2.15 Messung von intrazellulärem ROS am Durchflusszytometer

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurden mit dem Farbstoff CM-H₂DCFDA (Invitrogen) gemessen. Das Chlormethylderivat diffundiert passiv in die Zellen. Dort werden seine Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Die Thiol-reaktive Chlormethylgruppe reagiert mit intrazellulärem Glutathion und weiteren Thiolen. Durch anschließend oxidierende Agenzien in der Zelle entsteht ein fluoreszierendes Addukt, was auch für längere Zeit in der Zelle nachweisbar bleibt (nach *Thermo Scientific*). Die Fluoreszenz kann im FITC-Kanal am Durchflusszytometer gemessen werden. Alle folgenden Schritte fanden im Dunkeln statt. Die in einem 15 ml Greiner-Röhrchen befindlichen Zellen wurden mit 5 µl CM-H₂DCFDA (Endkonz. 6,25 µM) pro ml X-VIVO15 für 30 bzw. 70 min im Inkubator kultiviert. Dabei wurden sie mit dem Farbstoff „beladen“ und 1 min nach einer Exposition mit 1 Gy auf Eis gestellt. Die Zellen

wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen, das Pellet in kaltem PBS aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer der relative ROS-Level gemessen (Mittlere Fluoreszenz (*Mean*) im Histogramm). Bei der Berechnung der Induktion an ROS wurde dem *Mean* der Behandlung der *Mean* der unbehandelten Probe subtrahiert. Als Kontrolle wurden CM-H₂DCFDA ungefärbte Proben mitgemessen, um beim *Gating* eine mögliche Autofluoreszenz berücksichtigen zu können.

2.2.16 Messung der Autophagie am Durchflusszytometer

Autophagie wurde mittels CYTO-ID® Autophagie Detektions Kit (ENZO Life Sciences) gemessen. CYTO-ID® färbt akkumulierende, autophagische Vakuolen. Die bestrahlten Zellen wurden 18 h vor Ernte mit 10 µM Chloroquin behandelt. Chloroquin bewirkt eine Akkumulation autophagischer Vakuolen, indem es die Verschmelzung mit den Lysosomen verhindert. Somit kann der Prozess der Autophagie effizienter angefärbt werden. Nach der Ernte wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers in einem 15 ml Greiner-Röhrchen in Phenolrot-freiem Medium mit 4 % FCS im Inkubator für 30 min inkubiert. Nach Zugabe einiger Milliliter PBS wurden die Zellen 5 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nochmals mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Messung des CYTO-ID® erfolgte am Durchflusszytometer. Als Kontrolle wurden jeweils CYTO-ID® ungefärbte Proben, um beim *Gating* eine mögliche Autofluoreszenz berücksichtigen zu können.

2.2.17 Messung der Seneszenz am Durchflusszytometer

Senescente Zellen zeigen eine erhöhte Aktivität der beta-Galaktosidase. Fluoreszein Di-β-D-Galaktopyranosidase (FDG) ist ein sehr sensibles Substrat des Enzyms. Das nicht-fluoreszierende FDG wird durch die beta-Galaktosidase schrittweise hydrolysiert, wobei fluoreszierendes FDG entsteht, dessen Signal am Durchflusszytometer gemessen werden kann. Die Zellen wurden 24 h nach IR geerntet und das Pellet in 2 ml X-VIVO15 aufgenommen. Nach Zugabe von 33 µl der 2 mM FDG-Lösung wurden die Zellen 1 h im Dunkeln im Inkubator gelagert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet 2 x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 350 µl PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen für die anschließende Analyse am Durchflusszytometer überführt.

2.2.18 Vorbehandlung der Deckgläser für die Immunfärbung

20 x 20 mm Deckgläser wurden für 20 min in Diethylether gelagert. Anschließend wurden sie mit 100 % Ethanol gewaschen, danach in 70 % Ethanol und im Anschluss in ddH₂O. Die

Deckgläser werden in 1 N HCl für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert, danach mit ddH₂O gewaschen und in 70 % Ethanol gelagert.

2.2.19 Probenauftragung für die γ H2AX-Immunfärbung

Die Methoden der γ H2AX-Färbung können im Detail in der Publikation *Heylmann and Kaina (2016)* nachgelesen werden. Die Probenauftragung auf das Deckglas erfolgte entweder durch Auftropfen von 1 - 3 μ l einer Suspension von PBMCs oder Granulozyten (in PBS) oder über das Ausstreichen von peripherem Blut aus der Fingerspitze oder *Buffy Coat* auf einen herkömmlichen Objektträger. Für den Ausstrich wurde das Blut auf den Objektträger getropft, entweder mit einer Pipette oder durch Tupfen mit den für die Bluttropfenmethode verwendeten heparinisierten Glaskapillarröhrchen. Ein weiterer Objektträger wurde mit der schmalen Seite auf den Tropfen Blut gedrückt und in einem Zuge über den Träger ausgestrichen. Nach kurzem Eintrocknen des Blutes bzw. kurz nach Eintrocknen der Zellsuspension in PBS wurden die Zellen für die Immunfärbung fixiert. Der Blutausstrich wurde zuvor noch mit einem Fettstift auf einen kleineren Bereich eingegrenzt, um die Menge an Antikörperlösungen zu minimieren.

2.2.20 Immunfärbung von γ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche

- Immunfärbung für die Auswertung am Metafer

Die Fixierung und das Waschen der Blutausstriche erfolgten in Glasküvetten; PBMCs/Granulozyten wurden auf Deckgläser je in einem Well einer 6 Wellplatte fixiert und gewaschen. Für das Metafer wurden die Zellen 10 min bei Rt in 4 % igem Paraformaldehyd fixiert. Nach 1 x Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere 10 min bei -20 °C in eiskaltem Methanol inkubiert. Nach 2 x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 10 % Ziegen Serum + 0,1 % Triton in PBS geblockt. Blutausstriche wurden dafür in spezielle Objektträgerhalter gelegt. Dann wurden die Zellen mit dem 1. AK γ H2AX (1:1000 in 1 % BSA, 0,1 % Triton in PBS verdünnt) ü.N. im Kühlschrank oder 1:100 1 h bei Rt überschichtet. Die Zellen dürfen in dieser Zeit nicht austrocknen. Danach wurden die Zellen 3 x 5 min mit PBS auf einem Schüttler gewaschen (Blutausstriche in Glasküvetten, PBMCs/Granulozyten in 6 Wellplatten). Danach wurden die Zellen mit dem 2. AK AlexaFluor488 (1:300 in 1 % BSA, 0,1 % Triton in PBS) für 1 h bei Rt überschichtet. Dabei wird der 1. AK mit dem 2. AK markiert, wobei das Fluorochrom AlexaFluor488 des 2. AK später am Mikroskop detektiert werden kann. Nach erneutem 3 x Waschen für 5 min mit PBS wurden die Zellen mit Vectashield + DAPI eingedeckt (die auf Deckgläser befindlichen PBMCs/Granulozyten auf Mikroskop-Objektträger; die auf Mikroskop-Objektträgern befindlichen Blutausstriche mit Deckgläsern) und die Deckgläser mit Nagellack luftdicht verschlossen.

- Immunfärbung für die Auswertung am LSM (konfokales Mikroskop)

Die LSM-Methode ermöglicht es, zusätzlich zur γ H2AX-Färbung auch spezifische Zelltypen über Markierung ihrer Oberflächenrezeptoren (CD) anzufärben. Die Methode für das LSM unterscheidet sich von der Metafer-Methode in den Fixierungsschritten, der verwendeten AK-Kombinationen und der Kernfärbung. Die Zellen wurden 6 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einem Methanol:Aceton Gemisch (7:3) permeabilisiert. Nach 1 x Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min bei Rt mit 2,5 % Paraformaldehyd inkubiert. Nach 2 x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 10 % Ziegen Serum in PBS geblockt. Dann wurden die Zellen mit einer Lösung des 1. AK gegen γ H2AX (1:1000 in 1 % BSA in PBS) und zusätzlich einem weiteren 1. AK (andere Spezies als 1. AK gegen γ H2AX) gegen ein spezielles CD (1:200 im selben Reaktionsansatz) ü.N. im Kühlschrank überschichtet. Alternativ ist es möglich, die 1. AK in einer Verdünnung von 1:100 anzusetzen und die Inkubationszeit auf 1 h bei Rt zu verkürzen. Nach 3 x Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer Lösung der 2. AK AlexaFluor488 (1:300 in 1 % BSA in PBS) und Cy3 (1:500 in 1 % BSA in PBS) für 1 h bei Rt inkubiert. Nach 3 x Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min mit TO-PRO-3 1:100 in PBS inkubiert, um den Zellkern anzufärben. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Proben mit Vectashield eingedeckt.

Anstelle für γ H2AX konnten auch Antikörper gegen pATM, pKAP-1, 53BP1 und RPA verwendet werden.

2.2.21 Imaging und Auswertung der Immunfärbungen

Das *Metafer Slide Scanning* der DAPI und AlexaFluor488 Signale wurde mit dem Axio Imager M1 (Carl Zeiss) mit der Metafer4 Software (Metasystems) durchgeführt (*Integration Time* 0,0833 sek). Dabei werden automatisch Aufnahmen einzelner Zellen abgespeichert. Die Foci wurden mit einem Makro im Programm *ImageJ* gezählt.

Die *Laser Scanning Microscopy* (LSM) wurde mit dem LSM710 (Carl Zeiss) und der ZEN Software durchgeführt. Dabei wurden die Signale für TO-PRO-3, AlexaFluor488 und Cy3 in den jeweiligen Kanälen abgescannt. Die Foci wurden entweder per Auge gezählt oder die Mittlere Intensität des AlexaFluor488 Signals (z.B. γ H2AX) innerhalb des Kerns mit *ImageJ* gemessen. Durch Aufnahme und Überlagern (*Mergen*) verschiedener Querschnitte konnten die Zellen in 3D dargestellt werden (sog. *Z-Stacks*).

2.2.22 AIF- und PAR-Färbung für die Auswertung am LSM

Für die AIF-Färbung wurden die Zellen 15 min bei 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die Lösungen (10 % Ziegenserum und AK) enthielten zusätzlich 0,2 % Triton. Der 1. AK AIF

(D39D2)XP wurde 1:400 verdünnt und ü.N. bei 4 °C inkubiert. 2. AK war AlexaFluor488. Alle sonstigen Schritte sind in 2.2.20 (LSM) beschrieben.

Für die PAR-Färbung wurden die Zellen in Methanol für 7 min bei - 20 °C fixiert. Geblockt wurde mit 5 % Milchpulver + 0,1 % Tween-20 in PBS für 1 h. Der 1. AK 10 H aus Maus gegen PAR wurde 1:300 in 5 % Milchpulver + 0,1 % Tween-20 verdünnt und ü.N. bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Als 2. AK dienten auch hier AlexaFluor488-gekoppelte Antikörper. Alle sonstigen Schritte sind in 2.2.20 (LSM) beschrieben.

2.2.23 Neutrale Einzelzellgelelektrophorese (Neutraler Comet Assay)

Mit dem neutralen *Comet*-Assay werden DSB gemessen (Ostling, Johanson 1984). Dabei werden die DSBs auf Einzelzellebene detektiert. Die Zellen bzw. Zellkerne werden dafür in Agarose gebettet und einer Elektrophorese unterzogen. Liegt die DNA aufgrund von DSB fragmentiert vor, so wandert sie im elektrischen Feld und bildet Schweife ähnlich einem Kometen. Dabei steht die Länge des Schweifes im Verhältnis zur Menge an DSBs. Die Objektträger wurden mit 1,5 % Agarose beschichtet. 10 µl der Zellen, die zuvor bestrahlt und auf Eis gestellt wurden, wurden in 120 µl LMP (*low melting point*)-Agarose aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf die beschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Lagerung von 5 Minuten bei 4°C wurden diese entfernt. Der vorgekühlte, neutrale Lysepuffer wurde mit 1 % Triton-X-100 und 10 % DMSO versetzt. Anschließend wurden die Präparate für eine 1 h bei 4°C in neutralem Lysepuffer inkubiert. Dann folgte eine Elektrophorese für 22 min bei 25 V in 4°C kaltem Elektrophoresepuffer. Die Proben wurden in ddH₂O gewaschen und 5 Minuten in 98 %igem Ethanol fixiert. Danach wurden die Proben für 2 h bei Rt getrocknet. Im Anschluss wurden die Objektträger mit 50 µl PI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop Olymp mit einer CCD-Kamera analysiert. Je Probe wurden 50 Zellen ausgezählt. Es wurde die relative Kometenlänge (OTM, eng. *Olive Tail Moment*) und die Intensität des Schweifes (*Tail Intensity*) gemessen. OTM ist als das Produkt der prozentualen DNA-Menge im Kometenschweif und der Distanz zwischen den Zentren von Kometen-Kopf und Kometen-Schwanz definiert. Die Schweifintensität gibt direkt das Signal des Schweifes an und somit die Menge an fragmentierter DNA, die im elektrischen Feld gewandert ist. Als Analysesoftware wurde *Kinetic Imaging Comet* 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim) verwendet.

2.2.24 Alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Alkalischer Comet Assay)

Beim alkalischen *Comet* Assay erfolgte die Lyse im alkalischen Puffer, der die Wasserstoffbrücken der DNA auflöst, sodass die DNA einzelsträngig vorliegt und somit auch

SSB detektiert werden können. Die Proben wurden 50 min im alkalischen Lysepuffer lysiert. Im Anschluss wurde die DNA 20 min in alkalischem Elektrophoresepuffer denaturiert. Danach erfolgte die Elektrophorese für 15 min bei 23 V (300 mA). Die Präparate wurden 3 x 5 min in Neutralisationspuffer gewaschen, in 98 % Ethanol fixiert und getrocknet.

2.2.25 Herstellung von Gesamtzellextrakten für Proteinanalysen

Die Zellen wurden geerntet und in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1,5 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppli überführt. Nach erneutem Zentrifugieren mit 4000 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

Das Pellet wurde in entsprechenden Volumina von 50 - 200 µl Lysepuffer G + 1fach Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe bei 14 000 rpm und 4 °C für 25 min zentrifugiert. Die Protein-Überstände wurden in frische Eppis überführt und bei -20 °C gelagert.

Alternativ wurde die Zellen in einem Gemisch aus RIPA Puffer (835 µl), PMSF (10 µl aus 100 mM Stammlösung), Na₃VO₄ (10 µl 200 mM Stammlösung), 7fach Protease-Inhibitor (142,9 µl, Roche, Mannheim) und DTT (2 µl aus 2 M Stammlösung) auf Eis resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Sonifizierung (Ultraschall, 3 x 10 Pulseinheiten), um die DNA und Zellmembran aufzuschließen. Danach wurde die Probe bei 14 000 rpm und 4 °C für 25 min zentrifugiert, die Überstände in ein frisches Eppli überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.26 Bestimmung der Proteinmenge mit der Bradford-Methode

Für die photometrische, quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Bradfordmethode benutzt. Das Prinzip ist die Komplex-Bildung des Farbstoffes Comassie-Brilliant-Blau mit den Proteinseitenketten in saurer Lösung. Dabei verschiebt sich das Absorptionsspektrum von 470 auf 595 nm. Die Absorption kann bei 595 nm über ein Photometer gemessen werden und steht im Verhältnis zur Proteinkonzentration.

1 µl der Gesamtzellextrakte wurde je in ein Well einer 96-Wellplatte gegeben und mit 200 µl der Bradfordlösung versetzt. Gleichzeitig wurde eine BSA-Eichgerade erstellt (0 - 8 µg BSA + 200 µl Bradfordlösung pro Well), um die gemessene Proteinkonzentration der Extrakte errechnen zu können. Die Absorption am Photometer wurde 10 min nach Zugabe der Bradfordlösung gemessen.

2.2.27 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die durch SDS negativ-geladenen Proteine wurden gelelektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies erfolgte mit 10 bzw. 12 % Polyacrylamidgele. Zuerst wurde das Gemisch für das Trenngel zwischen die Glasplatten der Gelkammer gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisationszeit wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgelgemisch über das Trenngel gegossen. Darin wurde sofort ein 1,5 mm breiter Kamm für die Sammeltaschen eingebracht. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Gelkammer eingespannt und mit SDS-PAGE Laufpuffer aufgefüllt und die Taschen mit diesem ausgespült.

Je Tasche wurde die gleiche Menge an Protein aufgetragen (je nach Experiment 30 - 70 µg Protein je Tasche). Dabei wurde ein Gemisch von 4 x Ladepuffer mit der errechneten Proteinmenge der Extrakte hergestellt, aufgefüllt mit ddH₂O auf 30 - 40 µl. Dieses wurde vor Auftragung auf das Gel für 5 min bei 95 °C bzw. 56 °C im Heizblock erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Zusätzlich wurde ein gefärbter Proteinmarker in eine Tasche geladen.

Die Elektrophorese fand bei 60 V (25 mA) im Sammelgel, nach Erreichen der Laufront am Trenngel bei 120 V (40 mA) statt.

2.2.28 Western Blot Transfer und Ponceau S-Färbung

Die im Gel befindlichen, negativ-geladenen Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Nassblotverfahren übertragen. Dies geschah elektrisch in einer mit Transferpuffer gefüllten *Tank-Blot*-Apparatur. Dabei wurde das Gel auf die Nitrozellulose-Membran gelegt und in einer Halterung mit 1 - 2 Stück Filterpapier (*Whatman Paper*) und Schwämmen beidseitig eingeklemmt. Die Halterung wurde so in die Apparatur gebaut, dass das Gel auf die Kathoden- und die Membran auf Anodenseite gerichtet war. Der Proteintransfer fand bei 300 mA für 1 h statt. Die *Tank-Blot*-Apparatur stand dabei auf Eis.

Der Protein-Transfer wurde durch Färben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S überprüft und die Färbung anschließend mit TBS-T abgewaschen.

2.2.29 Analyse von Proteinen am Odyssey®-Infrared-Imaging-System

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran 1 h mit 5 % Milchlösung in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 1. AK in der entsprechenden Blockierungslösung ü.N. bei 4 °C. Die Membran wurde 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit einem Infrarot-Farbstoff gekoppelten 2. AK (1:10 000 in TBS-T) im Dunkeln für 1 - 2 h bei Rt inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS-T wurde die Membran getrocknet und die Proteine bzw. Infrarotsignale am

Odyssey®-Infrared-Imaging-System gescannt. Mithilfe des Systems war es möglich, bis zu zwei Antikörper (je aus Maus und Kaninchen) gleichzeitig auf einer Membran zu detektieren (rote und grüne Darstellung in den Kanälen 700 bzw. 800 nm).

2.2.30 Caspase-3/7 Aktivitäts-Assay

Der Caspase-3/7 Aktivitäts-Assay erfolgte nach dem Protokoll der Firma Promega Caspase-Glo® 3/7 Assay. Dabei spalten die aktiven Caspasen-3 und -7 ein luminogenes Substrat, wobei ein Substrat für die Luciferase (Aminoluciferin) entsteht, das über die Luciferase-Reaktion umgesetzt wird. Das dabei emittierte Licht wird gemessen und ist ein Maß der Caspaseaktivität. 10 000 Zellen/50 µl Medium, behandelt oder unbehandelt, wurden in eine weiße 96 Wellplatte (mit verkleinerten Wells) in Duplikaten pipettiert und für 6 bzw. 24 h im Inkubator kultiviert. Nach den Zeitpunkten wurde je Well 40 µl des Caspase 3/7 Reaktionsmix zugegeben, auf einen Schüttler gestellt und nach 1 h das Lumineszenzsignal am *TriStar 2 Multimode Reader* LB942 (*Berthold Technologies*) gemessen. Für den Leerwert (*Blank*) wurden Wells gemessen, die nur das Medium beinhalten. Dieser wurde von den gemessenen Werten subtrahiert.

2.2.31 RNA-Isolation für *Real-Time RT-PCR*

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin-RNA II Kit (Machery Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 40 µl RNase freiem ddH₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte spektrometrisch mit dem NanoDrop®-ND-1000 (*Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington*) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen H₂O (Ampuwa®, Fresenius) als Referenz. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml RNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ informiert über die Reinheit der RNA-Lösung und sollte bei RNA ≥ 2,0 betragen.

2.2.32 Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase

Um die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde die mRNA mit Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben. Die Synthese erfolgte über das Verso cDNA Kit (AbGene, Hamburg). 1 µg RNA wurde auf 11 µl mit H₂O (Ampuwa®, Fresenius) verdünnt. Der Ansatz wurde im *Thermocycler* 5 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Es wurden 9 µl Reverse Transkriptase (RT) Mix zugegeben:

5 x cDNA Synthese Puffer	4 µl
dNTP Mix	2 µl
Random Hexamer	1 µl
RT Enhancer	1 µl
Verso Enzym Mix	1 µl
	9 µl

Die Proben wurden im *Cycler* für 60 min bei 42 °C und danach 2 min bei 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben mit Zugabe von H₂O (Ampuwa®, Fresenius) auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

2.2.33 Semiquantitative *Real-Time* RT-PCR

Mithilfe der semiquantitativen *Real-Time* RT-PCR kann die Expression verschiedener Gene ermittelt werden. Dabei wird der Cyaninfarbstoff *SYBR Green* verwendet. Dieses bindet an doppelsträngige DNA, wobei ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff resultiert, der detektiert werden kann. Je mehr doppelsträngige DNA aufgrund der in der PCR-Reaktion auftretenden Amplifikationszyklen vorliegt, umso stärker ist die Intensität des Fluoreszenzsignals. Umso höher das Signal, desto höher war die Expression des spezifischen Genabschnitts in den Zellen.

Für die PCR wurde je Gen/Primerpaar ein Mastermix pipettiert:

2fach <i>SYBR Green</i>	10 µl
Primerpaar (up/down)	1 µl (0,5 µl/0,5 µl)
H ₂ O (Ampuwa®)	5,4 µl
MgCl ₂	1,6 µl
	18 µl

Die Primer wurden zuvor (je nach Hersteller) 1:5 bzw. 1:10 mit H₂O (Ampuwa®) verdünnt.

Pro Well einer 96 Wellplatte wurde 2 µl cDNA zugegeben. Dazu wurde 18 µl des Primer-Mastermix zugegeben (20 µl Endvolumen). Gemessen wurde in technischen Duplikaten. Als Kontrollen dienten die sog. *Non-Template-Control*, die anstelle von 2 µl cDNA H₂O (Ampuwa®) enthielt und eine *Non-ReverseTranskriptase-Control*. Hier wurde 2 µl eines cDNA-Mix

zugegeben, die bei der Generierung der cDNA keinen Verso-Enzym-Mix (somit keine Reverse Transkriptase), stattdessen H₂O (Ampuwa®) enthielt. Als Referenzgene wurden *ERCC6*, *UBE4A* und *ENOX2* verwendet (Primerdesign), die durch vorherige Analysen und der Software *Best Keeper*® als geeignet bestimmt wurden. Die Platte wurde mit einer speziellen lichtdurchlässigen Folie (Bio-Rad, München) versiegelt und 1 min bei 1000 rpm anzentrifugiert. Die PCR fand im *C1000 Thermal Cycler CFX96* (Bio-Rad) mit folgendem Programm statt:

Temperatur	Zeit	
95 °C	10 min	
95 °C Denaturierung	15 sek	 44x
56 °C Primerhybridisierung	15 sek	
72 °C Elongation	20 sek	
Erstellen der Schmelzkurve:		
95 °C	1 min	
55 °C	1 min	
55 °C - 95 °C in 0,5 °C Schritten	10 sek	

Bei der Messung werden sog. CT- (*Cycle Threshold*) Werte bestimmt, die den Anfang des exponentiellen Wachstums des Signals beschreiben. Je kleiner die CT-Werte, umso mehr mRNA lag vor bzw. umso höher war die Genexpression der jeweiligen Sequenz. Zur Verifizierung der Amplifikation wurde gegen Ende des Programms eine Schmelzkurve erstellt. Wurden dabei unspezifische Produkte detektiert, erfolgte der Ausschluss aus der Analyse.

Die Genexpressionsanalyse wurde über die Bio-RAD CFX-Manager Software 3.1 ausgewertet. Unstimulierte PBLs wurden dabei auf 1 normiert und die relative, normalisierte Expression der stimulierten PBLs im Vergleich dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion des Zelltodes von peripheren humanen Blutzellen nach verschiedenen Dosen ionisierender Strahlung

Periphere Blutzellen wurden aus dem *Buffy Coat* gesunder Spender mit unterschiedlichen Methoden isoliert bzw. ausgereift (siehe Kapitel 2.2.1 - 2.2.5; im Anhang Abb. 6.1). Die Zellen wurden mit geringen (0,125, 0,25 und 0,5 Gy) und hohen Dosen (1 und 2 Gy) γ -Strahlung behandelt. 24 h später wurde der induzierte Zelltod mittels AnnexinV gemessen (Abb. 3.1; im Anhang Abb. 6.2 und 6.3 für das *Gating*).

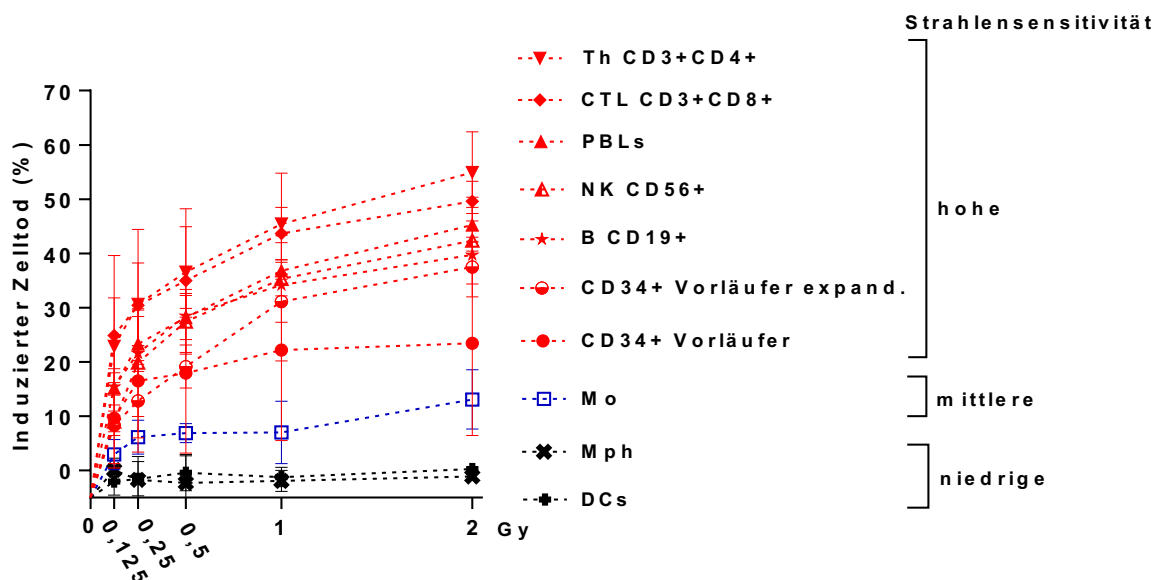


Abb. 3.1: Induzierter Zelltod (AnnexinV) von peripheren, humanen Blutzellen 24 h nach ionisierender Strahlung. Zellen der lymphoiden Reihe sowie CD34+ Vorläuferzellen zeigen die höchste und myeloide Zellen wie Monozyten eine mittlere Strahlensensitivität. Makrophagen und Dendritische Zellen, die auch aus der myeloiden Reihe stammen und *in vitro* aus Monozyten ausgereift wurden, zeigen keine Strahlensensitivität. Mittelwert, SD, n = 3. Two-Way ANOVA (Tukey), *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; **0,125 Gy:** *CTL - DC; **0,25 Gy:** ***CTL/Th - DC/Mph; **0,5 Gy:** ***Th/CTL - Mph/DC, **Th - Mo, **B/PBL - Mph/DC, **NK - Mph, *CTL - Mo, *NK - DC; **1 Gy:** ***Th/CTL/PBL/B/NK/CD34expand. - Mph/DC, ***Th/CTL - Mo, **PBL - Mo, *B/NK - Mo; **2 Gy:** ***Th/CTL/PBL/B/NK/CD34expand. - Mph/DC, ***Th/CTL/PBL - Mo, **NK - Mo, **Th - CD34, *CTL - CD34, *B - Mo.

Vergleicht man die strahleninduzierten Zelltodwerte, so sind Zellen der lymphoiden Reihe wie PBLs, T-Helferzellen (Th), zytotoxische T-Zellen (CTL), natürliche Killerzellen (NK) und B-Zellen sowie CD34+ Vorläuferzellen sehr strahlensensitiv im Vergleich zu den myeloiden Zellen wie Monozyten und den daraus differenzierten, sehr strahlenresistenten Makrophagen (Mph) und Dendritischen Zellen (DCs). Diese Einstufung der Sensitivitäten gegenüber IR zeichnet sich schon nach sehr geringen Dosen von 0,125 und 0,25 Gy ab, wobei je nach

lymphoider Population bzw. CD34+ Vorläuferzelle ~ 10 – 30 % Zelltod induziert werden. Es ist hervorzuheben, dass die lymphoiden Zellen schon nach einem sehr frühen Zeitpunkt von 24 h in die Apoptose gehen. Bei den in der Krebstherapie relevanten Dosen von 1 und 2 Gy sterben zwischen 30 bis 50 % der lymphoiden Zellen und CD34+ Vorläuferzellen innerhalb eines Tages. Bei 2 Gy induzieren Monozyten ca. 10 % Zelltod, Mph und DCs zeigen auch bei dieser hohen Dosis keine Strahlensensitivität.

CD34+ Vorläuferzellen, die direkt nach Isolierung bestrahlt wurden, zeigen bei 1 und 2 Gy einen Abfall an induzierten AnnexinV-positiven Zellen im Vergleich zu bestrahlten, aber zuvor für 6 Tage in speziellen Stammzellexpansionsmedium kultivierten CD34+ Vorläuferzellen (CD34+ Vorläufer expand.). Dies liegt insbesondere an der massiven Fragmentierung der Zellen innerhalb des Reaktionsgefäßes; ein weiteres Anzeichen der Apoptose (Abb. 3.2; im Anhang Abb. 6.4). Die (unbestrahlte) Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Bei der Fragmentierung der Zellen wurde die Population im SSC/FSC nach links verschoben und der Wert sinkt unter 1. Da Th und CTL innerhalb der PBLs *gated* wurden, wurde hier der Verlust des CD4 bzw. CD8 Markers gemessen. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, entziehen sich durch erhöhte Fragmentierung vor allem CD34+ Vorläuferzellen der Eigenschaft, mit AnnexinV angefärbt werden zu können. Dies führt nach den Dosen von 1 und 2 Gy zu der in Abb. 3.1 beobachteten Plateaubildung.

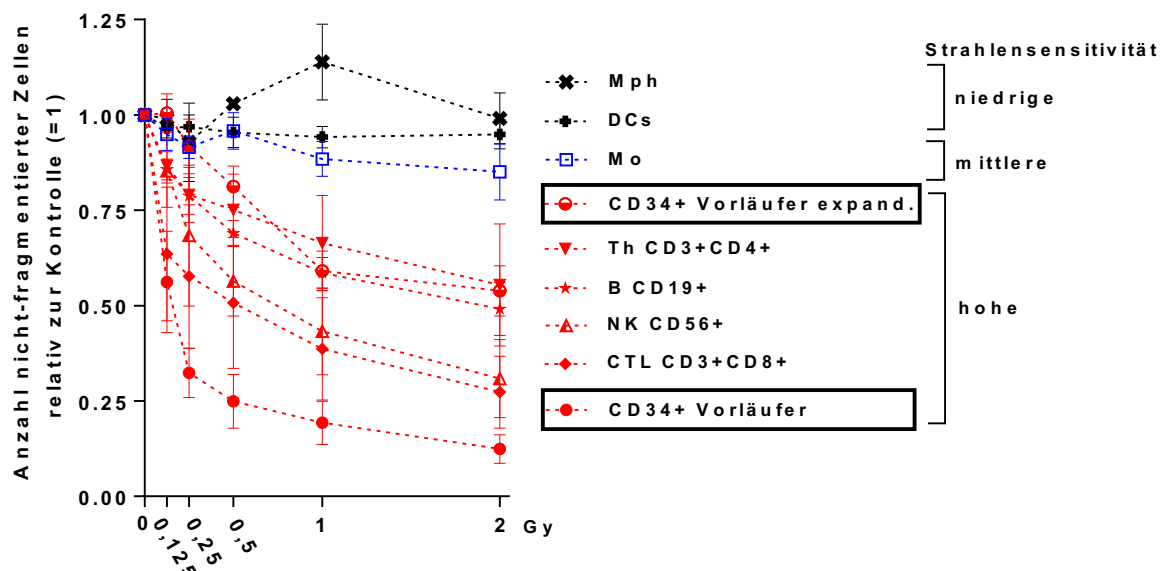


Abb. 3.2: Relative Anzahl nicht-fragmentierter Zellen zur unbestrahlten Probe (= 1) nach IR innerhalb des SSC/FSC-Blots bzw. Verlust des CD8+ und CD4+ Markers. Die Fragmentierung der Zellen innerhalb des Reaktionsgefäßes kann als weiteres Anzeichen der Apoptose gedeutet werden und geht einher mit ihrer Strahlensensitivität. Insbesondere die hochsensitiven, nicht expandierten CD34+ Vorläuferzellen bilden dabei nach Bestrahlung deutlich mehr Zelltrümmer als expandierte CD34+ Vorläuferzellen. Mittelwert, SD, n = 3.

Die aus der myeloiden Reihe hervorgehenden Granulozyten wurden aufgrund ihrer hohen basalen Positivität für AnnexinV (~ 80 %) nicht in Abb. 3.1 aufgeführt. Trotz der hohen basalen AnnexinV-Werte, aufgrund der sehr kurzen Lebensspanne von Granulozyten im peripheren Blut und unter Kultivierungsbedingungen, konnte nach IR-Exposition kein weiterer Zelltodanstieg festgestellt werden (Abb. 3.3). Somit können sie als strahlenresistent, aber auch aufgrund ihrer Kurzlebigkeit von 1 - 5 Tagen im peripheren Blut als schwierig zu kultivieren beschrieben werden. So zeigten Trypanfärbungen nach 6, 18 und 24 h basal einen Anstieg toter, Trypanblau-positiver Granulozyten (5 %, 20 %, 30 %), der nicht durch eine IR-Exposition von 0,25 - 4 Gy beeinflusst wurde (Haak, Masterarbeit 2016).

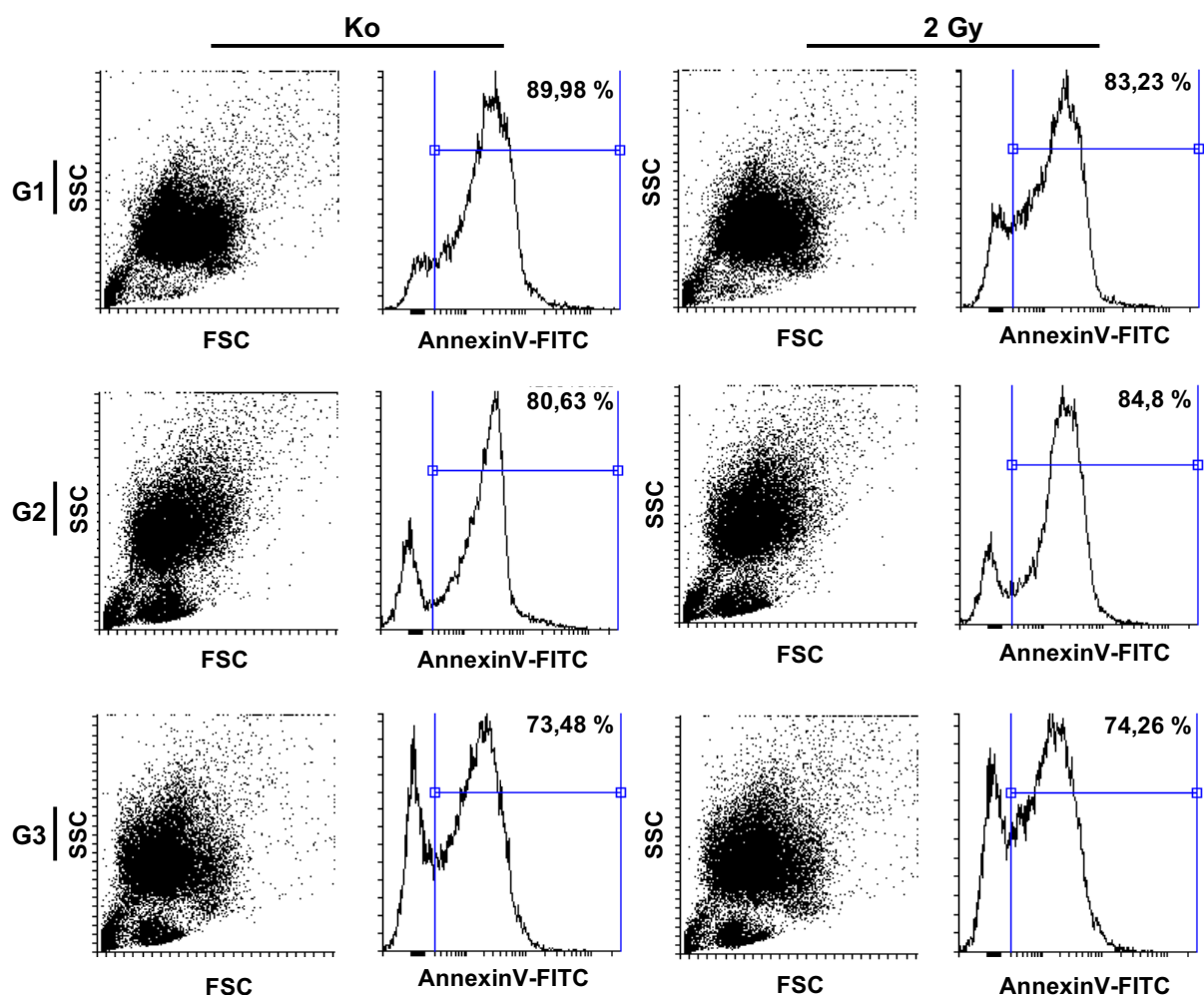


Abb. 3.3: SSC/FSC und AnnexinV-Färbung aufgereinigter Granulozyten aus unterschiedlichen *Buffy-Coats* (G1 - G3) 24 h unbehandelt (links) bzw. nach Bestrahlung mit 2 Gy (rechts). Die im peripheren Blut sehr kurzlebigen Granulozyten zeigen schon nach nur 24 h Kultivierung basal eine sehr hohe Anzahl apoptotischer Zellen. Nach Exposition mit IR wird kein weiterer Zelltod induziert.

3.2 Strahlensensitivität von regulatorischen T-Zellen, T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen

Treg, Th und CTL wurden aus der Gesamtlymphozytenfraktion (PBMCs nach Ficoll) mithilfe magnetischer *Beads* aufgereinigt (im Anhang Abb. 6.5) und bestrahlt. Nach 48 bzw. 72 h wurde der induzierte Zelltod über SubG1- bzw. AnnexinV-Färbung gemessen.

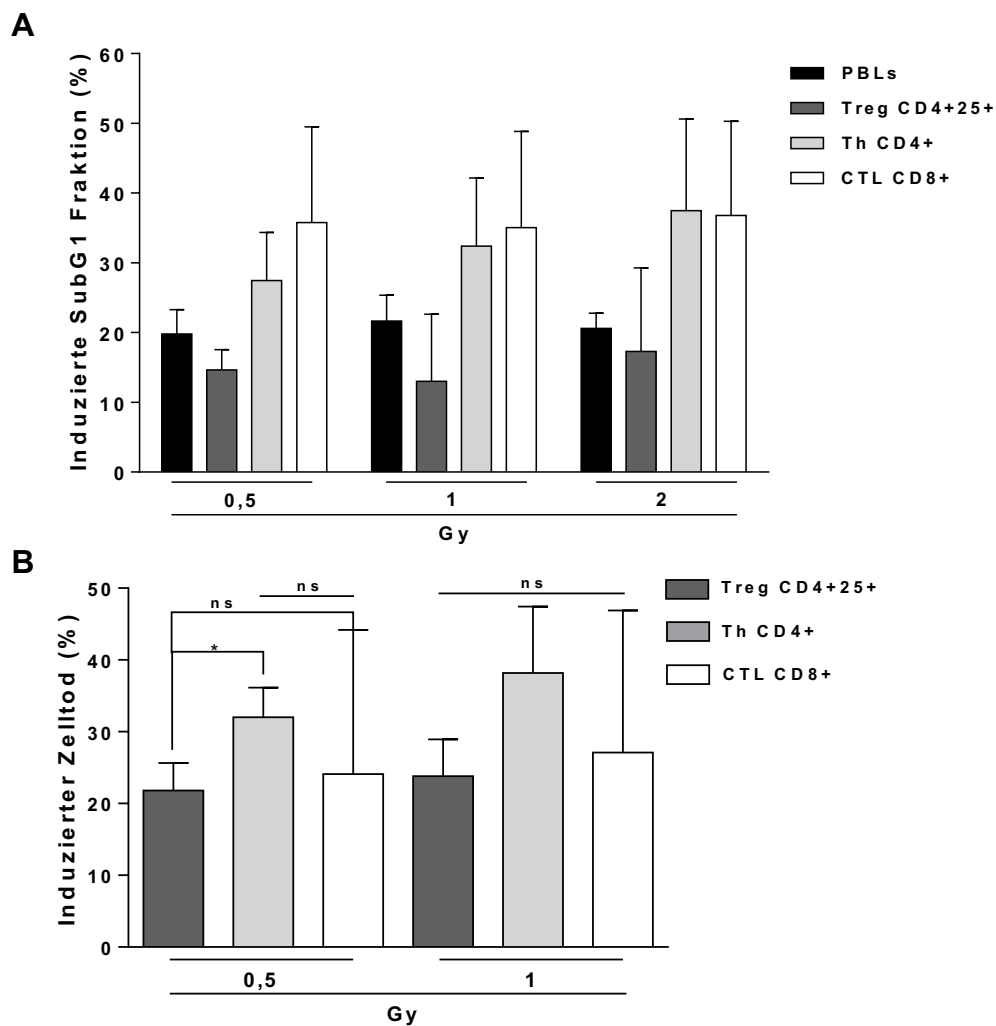


Abb. 3.4: Zelltodinduktion von Treg, Th und CTL nach verschiedenen Dosen IR. **A:** Strahleninduzierte SubG1 Fraktion nach 72 h als Zeichen der DNA Fragmentierung während der Apoptose in PBLs, Treg, Th, CTL. Treg zeigen tendenziell, aber nicht signifikant, eine geringere DNA Fragmentierung nach IR im Vergleich zu Th und CTLs. Mittelwert, SEM. Die spontanen Werte (ohne Bestrahlung) lagen zwischen 13 – 32 %. **B:** Strahleninduzierter Zelltod (AnnexinV) in Treg, Th und CTL nach 72 h. Treg zeigen bei 0,5 Gy signifikant weniger Zelltod als Th. Die Werte der CTL zeigen eine erhöhte interexperimentelle Varianz. Die basalen Werte (ohne Bestrahlung) lagen bei Treg (12 %), Th (28%) und CTL (46%). t-Test, *p < 0,05; ns, nicht signifikant, Mittelwert, SD, n = 3 - 6. Die Experimente wurden zusammen mit Dr. Martina Bauer durchgeführt.

Vergleicht man die strahleninduzierte DNA-Fragmentierung (SubG1) in Abb. 3.4 A zwischen den unterschiedlichen Zelltypen, so sind *Bead*-isolierte Treg (15 – 17 % SubG1) tendenziell strahlenresistenter als Th (27 – 37 %) und CTL (35 – 36 %). Aufgrund der hohen Varianz sind die Daten aber nicht signifikant. Zelltodmessungen mit AnnexinV zeigen jedoch, dass Treg mit 22 % induziertem Zelltod nach 0,5 Gy signifikant strahlenresistenter sind als Th mit 32 % Zelltodinduktion (Abb. 3.4 B). Die Zelltodwerte der CTL variieren stark interexperimentell (zwischen den *Buffy Coats*), weshalb keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu Treg bzw. Th erkennbar sind. Dies lag vermutlich an den nicht optimalen und schon sehr hohen basalen Zelltodwerten der CTL (46 %), was auf eine bereits gestresste Zellpopulation in der Kontrolle hindeutet.

3.3 Strahleninduzierte γ H2AX-Foci als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche in verschiedenen Blutzellpopulationen

Unterschiedliche Blutzellen wurden mittels magnetischer *Beads* aus *Buffy Coat* isoliert (im Anhang Abb. 6.1) und Monozyten wurden zu Makrophagen mit GM-CSF ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit 2 Gy IR bestrahlt und nach verschiedenen Zeitpunkten für die γ H2AX-Färbung fixiert.

Die zeitliche Abnahme des γ H2AX-Signals ist mit der Reparatur von DSB assoziiert und gibt die DNA-Reparatureffizienz der Zellen wieder, wobei das Maximum in der gemessenen Zeitspanne bei 1 h nach Bestrahlung auftritt (Abb. 3.5 A, absolute Werte). Die Blutzellen induzieren 1 h nach IR verstärkt γ H2AX-Foci. Die Foci nehmen innerhalb der Zeitpunkte von 4, 6 zu 24 h ab (Abb. 3.5 B, relative Werte, 1 h normiert auf 100 %). Die Zellen wiesen in der Kontrolle (0 h) im Mittel weniger als 5 γ H2AX-Foci auf. Lediglich Monozyten zeigten basal schon eine erhöhte Menge an γ H2AX-Foci, was vermutlich auf die Aufreinigungsmethode mit magnetischen *Beads* oder den dabei zusätzlich erzeugten zellulären Stress zurückzuführen ist.

1 h nach 2 Gy waren im Schnitt in Mph 18, Monozyten 17, CD34+ Vorläuferzellen 14, B-Zellen 13, T-Zellen 12 und in NK-Zellen 11 γ H2AX-Foci zu erkennen. T- und B-Zellen, sowie die CD34+ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut zeigen bis 6 h eine deutliche, Monozyten und NK-Zellen eine eher verzögerte Abnahme der Foci. 24 h nach IR erreichte die Anzahl der γ H2AX-Foci den Bereich des Kontrollniveaus (Mo 10, Mph 6, NK-Zellen 3, B- und T-Zellen 2,5 und CD34+ Vorläuferzellen 2 γ H2AX-Foci).

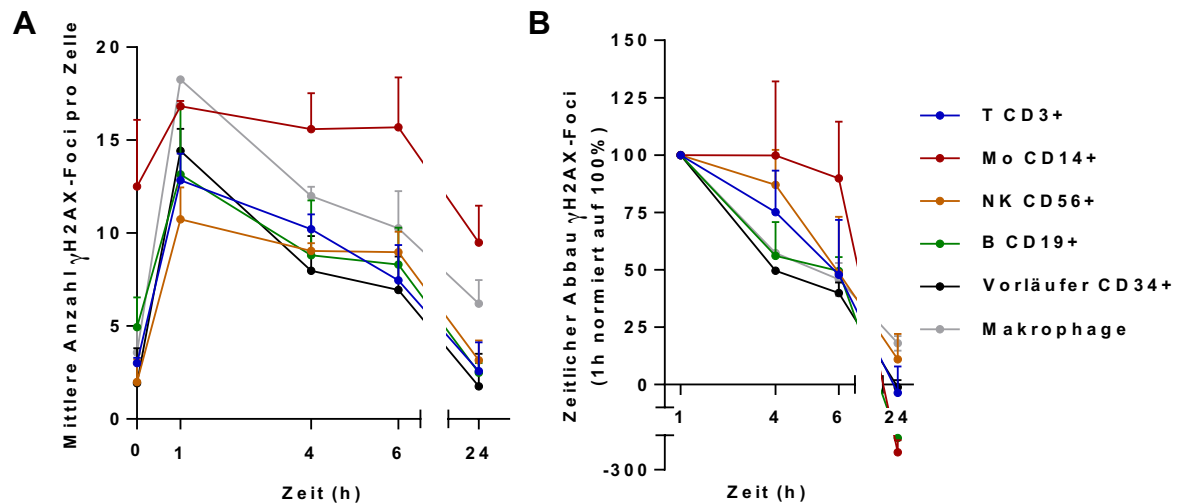


Abb. 3.5: Induktion und zeitliche Abnahme von γ H2AX-Foci als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur in verschiedenen Blutzellpopulationen nach 2 Gy. **A:** Absolute Anzahl von γ H2AX-Foci in der Kontrolle (0 h) und 1, 4, 6 und 24 h nach 2 Gy. Die Zellen zeigen eine signifikante Abnahme der γ H2AX-Signale bis 24 h. One-Way ANOVA (Dunnett), signifikante Unterschiede zum jeweiligen 1 h - Wert: T-Zellen 0 h, 6 h, 24 h; Mo 24 h; NK 0 h, 24 h; B-Zellen 0 h, 24 h; CD34+ 0 h, 4 h, 6 h, 24 h, Mph 0 h, 4 h, 6 h, 24 h. **B:** Relative Abnahme von γ H2AX-Foci im Vergleich zum 1 h Wert (dieser ist normiert auf 100 %). 1 h nach IR werden γ H2AX-Foci in den Zellen induziert. Der zeitliche Verlauf der Foci-Abnahme kann auf diesen Zeitpunkt normiert werden, um die Reparatur von DSB zu ermitteln. T- und B-Zellen als auch CD34+ Vorläuferzellen und Mph zeigen eine deutliche, zeitliche Abnahme von strahleninduzierten γ H2AX-Foci innerhalb der ersten 6 h. NK-Zellen und Monozyten hingegen eine verzögerte Abnahme. Alle Blutzelltypen erreichen 24 h nach IR eine Anzahl an γ H2AX-Foci im Bereich der Kontrolle, was auf eine vollständige Reparatur der IR-induzierten DNA-Schäden schließen lässt. Mittelwert, SD, n = 3 - 4 (pro Experiment bis zu 304 Zellen ausgezählt).

Abb. 3.6 A zeigt repräsentative Bilder der γ H2AX-Färbung. Jeder untersuchte Blutzelltyp induziert nach 1 h ein Maximum an γ H2AX-Foci und ist in der Lage, die durch IR induzierten DNA-Schäden innerhalb von 24 h zu reparieren. Dies lässt sich in der Abnahme der Anzahl an Foci im Zeitraum von 1 - 24 h nach Behandlung mit 2 Gy γ -Strahlung erkennen.

γ H2AX-Foci wurden in Granulozyten nicht am Metafer-Mikroskop untersucht, da sie schon in Versuchen am konfokalen Mikroskop (LSM) keine strahlenvermittelte Induktion von γ H2AX-Foci zeigten (Abb. 3.6 B). Dies ist vermutlich auf ihre eingeschränkte DNA-Reparaturkapazität und DNA-Schadensantwort zurückzuführen (Haak, Masterarbeit).

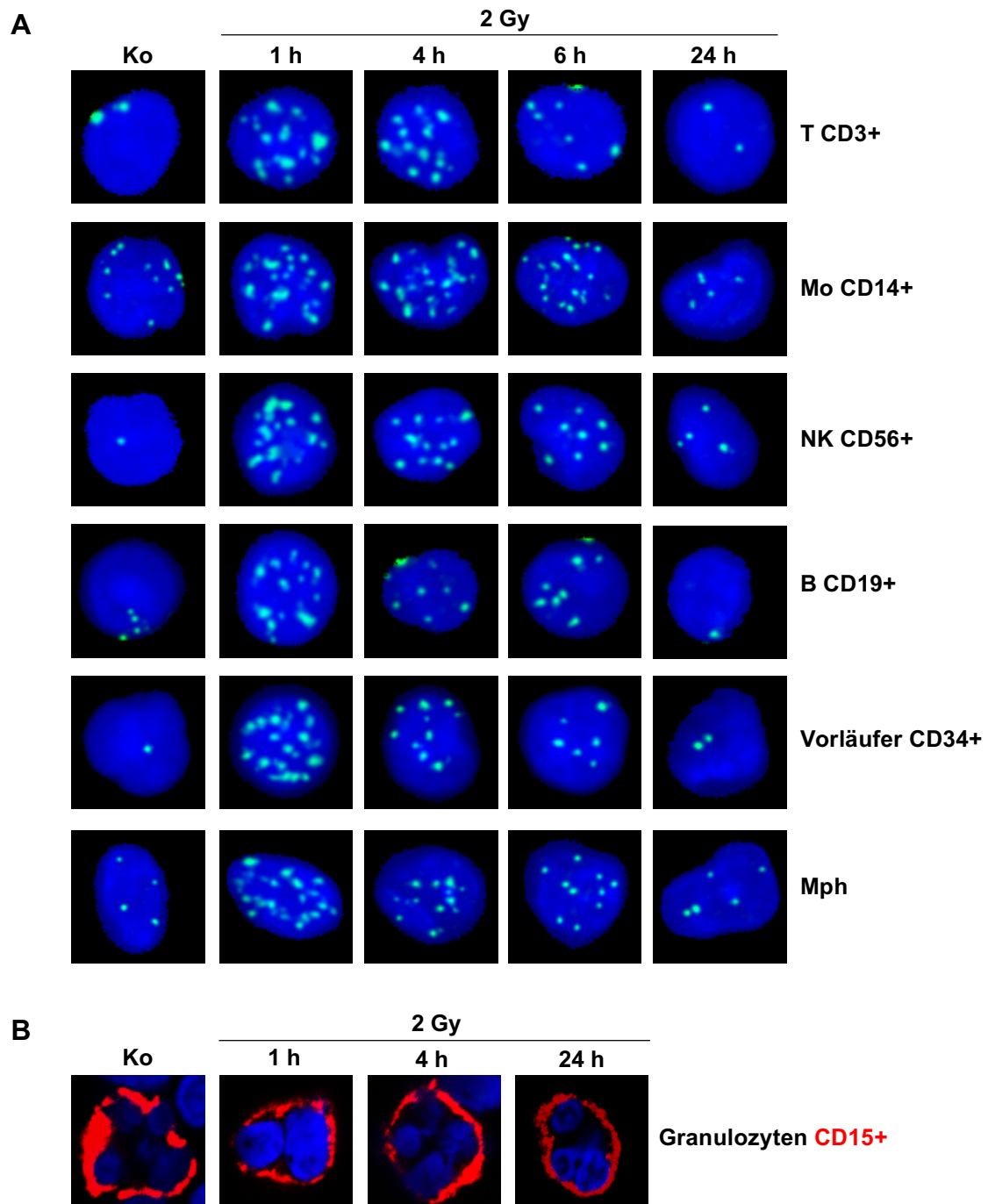


Abb. 3.6: Repräsentative Bilder der γ H2AX-Färbung in Blutzellen vor und nach Bestrahlung mit 2 Gy.

A (Metafer): Die Zellen wurden mit magnetischen *Beads* aufgereinigt bzw. Makrophagen aus Monozyten ausdifferenziert. 1 h nach IR wird eine deutliche Induktion an γ H2AX-Foci als Marker für DSB gemessen. Die zeitliche Abnahme der Foci ist mit einer Reparatur der DNA-Schäden assoziiert. 24 h nach IR erreichen die Zellen die Anzahl von γ H2AX-Foci, die mit den unbehandelten Kontrollen (Ko) vergleichbar ist. Eine Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden innerhalb von 24 h ist somit in allen Blutzellen zu erkennen. γ H2AX-Foci, grün; Kern, blau.

B (LSM): Repräsentative Bilder einer γ H2AX-Färbung von Granulozyten am LSM, die zusätzlich mit einem Oberflächenmarker für CD15 (rot) angefärbt wurden. Granulozyten zeigen keine IR-induzierten γ H2AX-Foci. γ H2AX-Foci, grün (nicht detektierbar); Kern, blau.

Die immunhistochemische Identifikation der γ H2AX-Foci und deren Akkumulation nach 24 h wurde zudem in PBMCs am LSM gemessen. Zusätzlich zu γ H2AX wurden hierbei T- und NK-Zellen sowie Monozyten und Granulozyten mit ihrem spezifischen Oberflächenrezeptor (CD3 für T-Zellen, CD14 für Monozyten, CD56+ für NK-Zellen, CD15+ für Granulozyten; jeweils in rot dargestellt) angefärbt (Abb. 3.7 A). Eine Aufreinigung mit magnetischen *Beads* war somit nicht erforderlich. Aufgrund ihrer sehr geringen Anzahl in PBMCs mussten B-Zellen und CD34+ Vorläuferzellen vor der Exposition mit IR mit magnetischen *Beads* aufgereinigt werden (CD19+ für B-Zellen, CD34+ für Vorläuferzellen; jeweils in rot dargestellt).

Alle untersuchten Blutzellen, ausgenommen Granulozyten, zeigen eine deutliche Induktion von γ H2AX 1 h nach IR (Abb. 3.7 A). 24 h nach IR waren in T- und NK- Zellen sowie in Monozyten keine γ H2AX-Foci mehr detektierbar, was auf nicht-persistierenden DNA-Schäden und eine effiziente Reparatur 2 Gy-induzierter Schäden hinweist. B-Zellen waren 24 h nach Bestrahlung nur schwer am konfokalen Mikroskop zu erkennen. Sie zeigten geschädigte Kerne, wohingegen CD34+ Vorläuferzellen 24 h nach IR morphologisch am Mikroskop kaum nachzuweisen waren (passend zur gemessenen, IR-vermittelten Fragmentierung der Zellen, dargestellt in Abb. 3.2).

Im Vergleich zum automatisierten Zählverfahren am Metafermikroskop, das mehrere hundert Zellen in kurzer Zeit auswerten kann, erkennt man bei der manuellen Analyse am LSM, dass insbesondere B- und CD34+ Vorläuferzellen 24 h nach IR deutliche morphologische Auffälligkeiten zeigen und somit eine Auswertung bzw. das „Finden“ morphologisch intakter Zellen per Auge schwierig ist. Zwar ist es durch konfokale Mikroskopie (LSM) möglich, mehrere Proteine gleichzeitig anzufärben (γ H2AX und CD-Oberflächenmoleküle), aber aufgrund des manuellen Scannens zum Auszählen mehrerer hundert Zellen pro Probe bei geringen Zelldichten nur bedingt anwendbar.

CD34+ Vorläuferzellen sind hinsichtlich ihrer sehr geringen Anzahl im peripheren Blut nur schwierig in großen Mengen aufzureinigen und zu analysieren. Deshalb wurde hier ein weiterer Schwerpunkt in der Quantifizierung der Reparaturkapazität von CD34+ Vorläuferzellen gelegt. Trotz ihrer hohen Strahlensensitivität und Zellfragmentierung nach IR konnte zwischen 1 h (16 Foci pro Zelle) und 4 h (7 Foci pro Zelle) eine signifikante Abnahme von γ H2AX-Foci und somit eine Reparatur IR-induzierter DNA-Schäden festgestellt werden (Abb. 3.7 B, mit repräsentativen Z-Stacks).

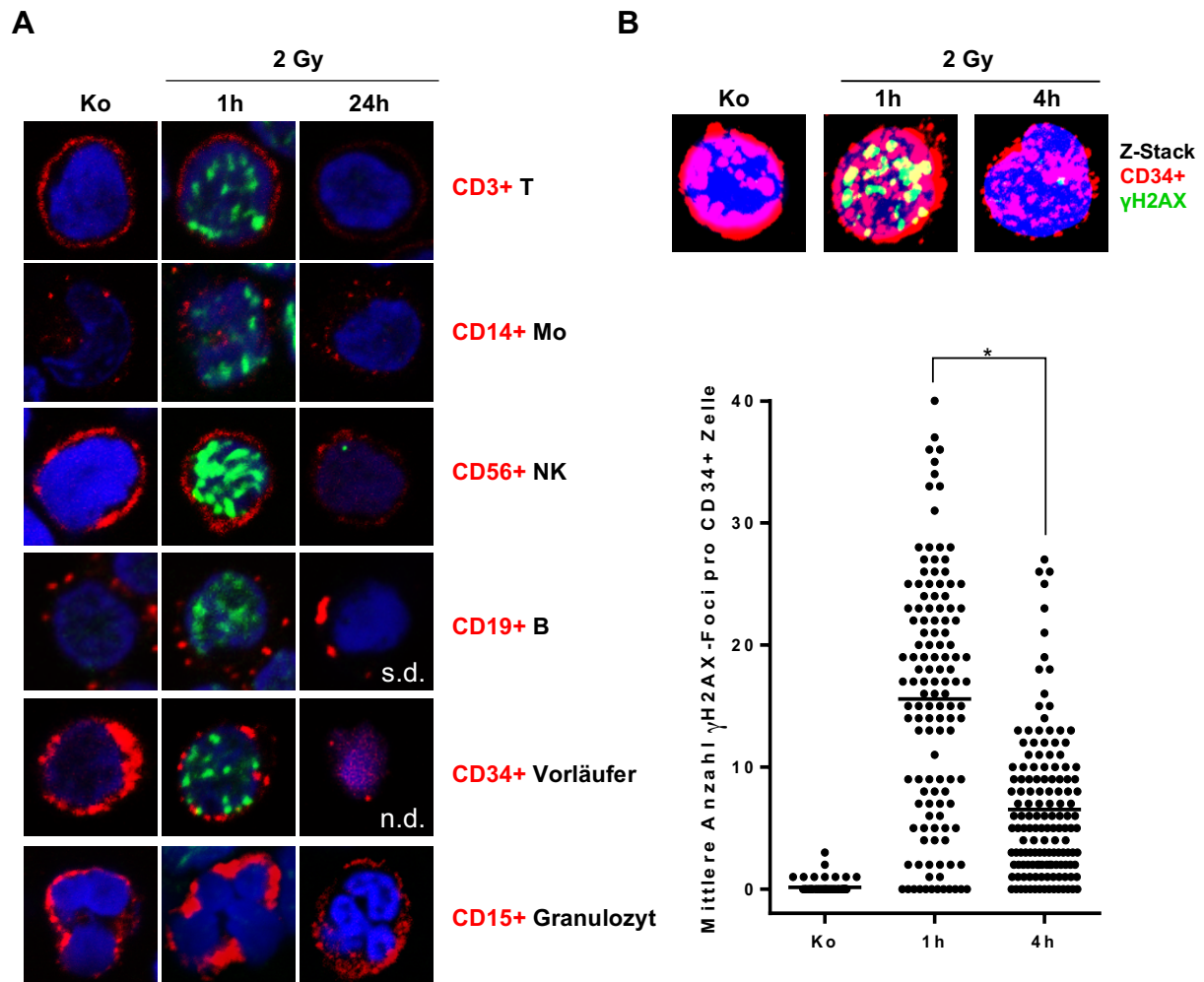


Abb. 3.7: γH2AX- und Oberflächenmarker-Färbung am konfokalen Mikroskop (LSM). A: Induktion von γH2AX-Foci 1 h nach IR und persistierende Foci nach 24 h. B: Kinetik von γH2AX-Foci in CD34+ Vorläuferzellen 1 h und 4 h nach IR. A: Zellen wurden zusätzlich mit den entsprechenden Oberflächenmarkern gefärbt (rot). Die Zellen, ausgenommen Granulozyten, zeigen 1 h nach IR eine deutliche Zunahme an γH2AX-Foci. 24 h später sind keine persistierenden Foci erkennbar, was auf eine effiziente DNA-Reparatur der Zellen schließen lässt. CD19+ B- und CD34+ Vorläuferzellen konnten aufgrund ihrer deutlich veränderten Morphologie am LSM nur bedingt quantitativ per Auge ausgewertet werden. Das hängt bei CD34+ Vorläuferzellen vor allem mit einer hohen, strahleninduzierten Fragmentierung der Zellen zusammen. Kontrolle (Ko), schwer definierbar (s.d.), nicht definierbar (n.d.). **B:** γH2AX-Kinetik in CD34+ Vorläuferzellen 1 h und 4 h nach 2 Gy IR. n = 3 (insgesamt 84 - 142 Zellen). t-Test, *p < 0,05. Repräsentative Bilder sind als Z-Stack dargestellt (3D-Bilder). Kern, blau; CD34 Oberflächenrezeptor, rot; γH2AX-Foci, grün.

Zusammengefasst zeigten die untersuchten Blutzellpopulationen nach Behandlung mit 2 Gy γ-Strahlung eine zeitliche Abnahme des γH2AX-Signals, was auf eine effiziente Reparatur von DSB hinweist. Die durch DNA-Schäden (gemessen als phosphoryliertes Histon 2AX) vermittelte DNA-Schadensantwort kann als Auslöser des Zelltodes in Betracht gezogen werden und wird im späteren Kapitel 3.13 näher betrachtet.

3.4 Vergleich T-Zelle versus Monozyt

T-Zellen sind strahlensensitiver als Monozyten (Abb. 3.8 A). Dies war aufgrund des Defekts von Monozyten in der BER und NHEJ und der damit zusammenhängenden Herabregulation der DNA Ligase III, XRCC1 und PARP-1 so nicht zu erwarten (Bauer *et al.*). T-Zellen exprimieren diese Proteine, zeigen jedoch eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber IR im Vergleich zu Monozyten (Abb. 3.8 B).

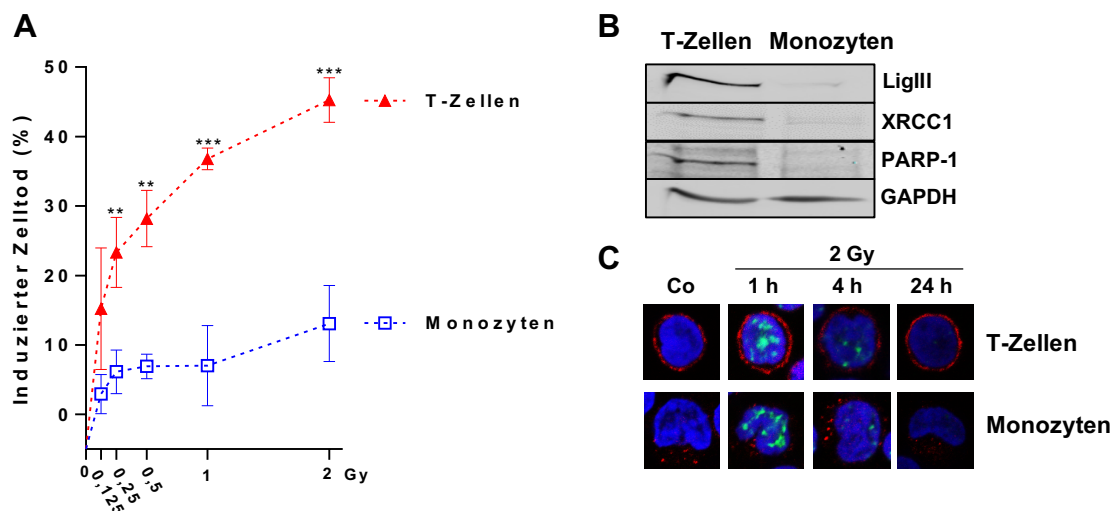


Abb. 3.8: Vergleich T-Zelle vs. Monozyt. **A:** AnnexinV-Messung am Durchflusszytometer, 24 h nach unterschiedlichen Dosen IR. t-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001. Mittelwert, SD, n = 3. **B:** Analyse der DNA-Reparaturproteine DNA Ligase III, XRCC1 und PARP-1 (Western Blot). Ladekontrolle GAPDH. **C:** Prozessierung von DSB (γ H2AX) nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Exposition mit 2 Gy. γ H2AX (grün) wurde in T-Zellen (CD3, rot) und Monozyten (CD14, rot) innerhalb PBMCs angefärbt und am LSM analysiert.

Betrachtet man die γ H2AX Kinetik in T-Zellen versus Monozyten (Oberflächenmarker-gefärbt in PBMCs) nach 2 Gy am LSM, so können keine Unterschiede in der Abnahme bzw. in der Prozessierung der DNA-Schäden festgestellt werden (Abb. 3.8, C). Die zuvor gezeigten Daten in Abb. 3.5 stellen die γ H2AX Kinetik von *Bead*-aufgereinigten T-Zellen bzw. Monozyten dar. Die dort beobachtete verzögerte Abnahme der γ H2AX-Foci in Monozyten ist vermutlich auf die *Bead-Isolation* und der sehr hohen basalen γ H2AX-Foci zurückzuführen. Grundsätzlich zeigten die am Metafer aufgenommenen Zellen eine verzögertere γ H2AX-Foci Abnahme als Zellen, die über das LSM analysiert wurden. Nach 24 h zeigten jedoch alle Blutzellen kaum bzw. keine IR-induzierten Foci mehr. Trotz der Herabregulation der BER und NHEJ können Monozyten 2 Gy-induzierte DNA-Schäden in Form von γ H2AX wie die Reparatur-profizienten T-Zellen prozessieren, induzieren dabei aber signifikant weniger Zelltod als T-Zellen.

3.5 γ H2AX in T-Zellen und Monozyten von Leukämiepatienten im Zeitraum einer Ganzkörperbestrahlung

In einer Kooperation mit der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz (mit PD Dr. med. Thomas Kindler) bestand die Möglichkeit, DNA-Schäden in Zellen aus Blutproben von Leukämiepatienten während des Zeitraums einer Ganzkörperbestrahlung zu untersuchen. Diese seltenen Fälle erlauben es, Strahleneffekte auf einen komplexen Organismus darstellen zu können und eine *in vivo* Situation mit den oben dargestellten *in vitro* Daten zu vergleichen. Die Ganzkörperbestrahlung fand nach einer Chemotherapie und vor einer Stammzelltransplantation statt. Die Bestrahlung führt zu einer kompletten Depletion hämatopoetischer Zellen, um durch die Stammzelltransplantation das blutbildende System wieder neu aufbauen zu können. Bei der Ganzkörperbestrahlung wurden die Patienten über einen Zeitraum von 3 Tagen mit einer kumulativen Dosis von 12 Gy bestrahlt (Abb. 3.9 Behandlungsschema). Blutproben wurden morgens vor dem täglichen Behandlungszyklus von 2 x 2 Gy (2 Gy morgens, 2 Gy abends, kumulativ 12 Gy an 3 Tagen) entnommen, im Labor aufgereinigt und für den entsprechenden Assay aufbereitet. Aufgrund der geringen Mengen an Blutvolumen und der aus der Behandlung hervorgehenden starken Depletion von Blutzellen von T1 zu T3 konnten pro Probe oft nur zwischen 11 und 50 Zellen pro γ H2AX-Versuch am LSM ausgewertet werden.

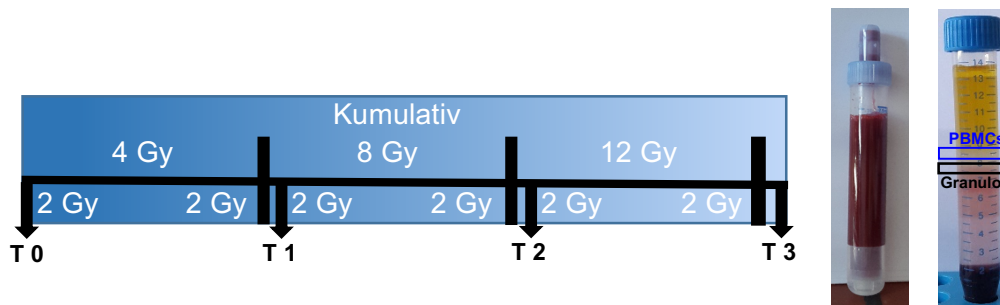


Abb. 3.9: Behandlungsschema einer Ganzkörperbestrahlung von Leukämiepatienten. Blutentnahmen fanden täglich vor dem Tagesbestrahlungszyklus von 2 Gy morgens und 2 Gy abends statt. PBMCS und Granulozyten wurden mittels Polymorphprep-Methode isoliert, für γ H2AX und den entsprechenden Oberflächenmarkern angefärbt und am konfokalen Mikroskop angefärbt. T0 (Kontrolle), T1 (4Gy), T2 (8Gy), T3 (12Gy).

Aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte von Blutentnahme und Strahlungsexposition kann hier von persistierenden Foci gesprochen werden, da der Zeitpunkt von 1 h, der in den *in vitro* Versuchen die maximale Anzahl induzierter γ H2AX-Foci zeigt, deutlich überschritten ist. Im Folgenden wurden γ H2AX-Foci in CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten von 3 ausgewählten Patienten (P1 - P3) am konfokalen Mikroskop betrachtet und quantifiziert (Abb. 3.10). Interessanterweise zeigen insbesondere T-Zellen mehr persistierende γ H2AX-Foci und somit assoziiert mehr DNA-Schäden im Verlauf der Behandlung als Monozyten. Dies geht einher mit der erhöhten Strahlensensitivität von T-Zellen im Vergleich zu Monozyten (Abb. 3.1). P1 zeigte

einen Anstieg der γ H2AX-Foci in T-Zellen im Verlauf des Untersuchungszeitraums auf eine mittlere Anzahl von 12 Foci an T3. Monozyten zeigten eine Zunahme des γ H2AX-Signals bis auf 6 Foci an T3. In P2 war die höchste Anzahl von γ H2AX-Foci in T-Zellen an T1 (10 Foci) festzustellen, an T2 und T3 zeigten sie im Mittel 7 γ H2AX-Foci pro Zelle. In Monozyten wurde kein deutlicher Anstieg von γ H2AX-Foci gemessen und nur eine mittlere Anzahl von 3 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert. P3 wies ab T1 bis T3 in T-Zellen 9 -15 γ H2AX-Foci, in Monozyten 3 bis 9 Foci auf.

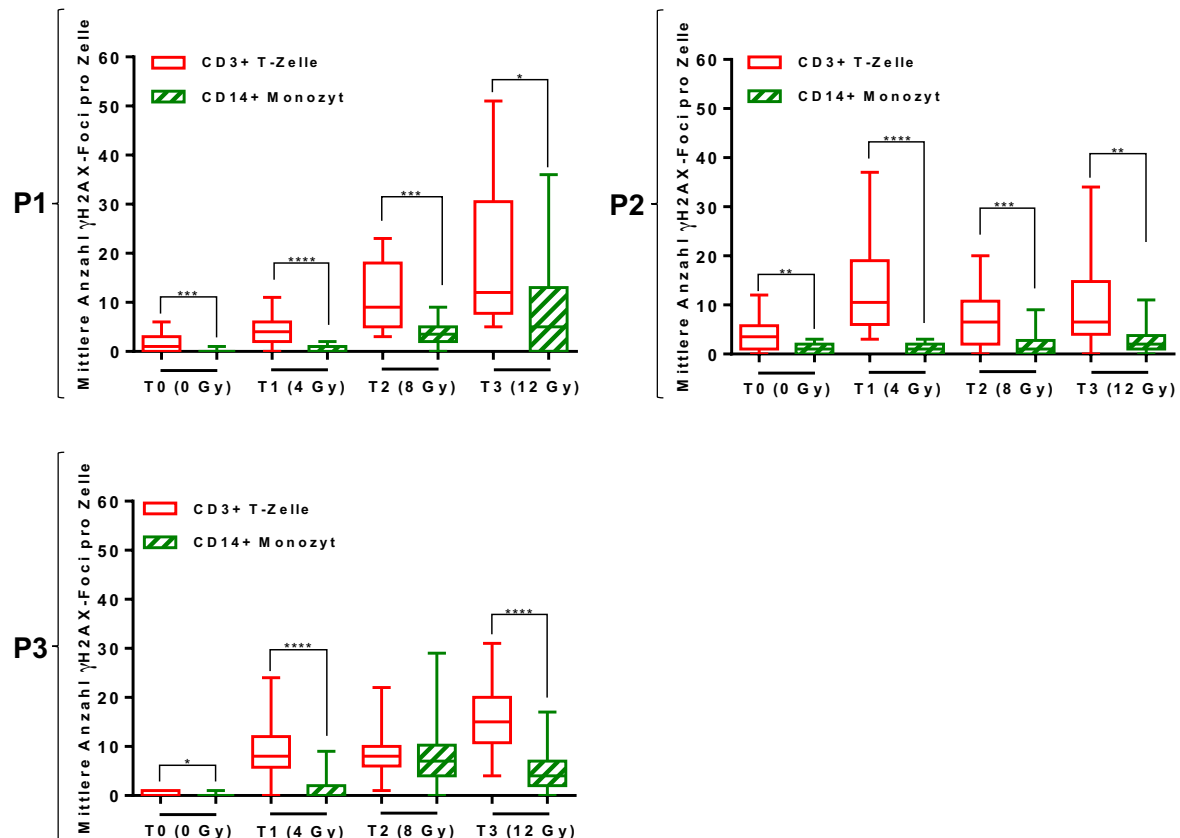


Abb. 3.10: Quantifizierung und Vergleich von γ H2AX Foci in CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten aus Blutproben von Leukämiepatienten während einer Ganzkörperbestrahlung. T0 Blutentnahme vor der ersten Tagesbestrahlungseinheit von 2 x 2 Gy. Blutentnahmen an T1 und T2 jeweils morgens vor der nächsten Bestrahlungseinheit, Blutentnahme an T3 morgens nach dem letzten Bestrahlungszyklus an T2 (Abb. 3.9). P1 = Patient 1, P2 = Patient 2, P3 = Patient 3. 11 - 50 Zellen pro Probe. t-Test, ****p < 0,0001, ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

Mögliche Depletions- und Kompensationsmechanismen, wie z.B. eine Neubildung der Zellen aus Vorläufern aus dem Knochenmark, werden in der Diskussion näher betrachtet. Abb. 3.11 zeigt repräsentative Bilder der γ H2AX-Färbungen von T-Zellen und Monozyten sowie Granulozyten der in Abb. 3.10 erwähnten Patienten. Auch hier konnte in Granulozyten (einmal CD64, ein anderes Mal CD15 gefärbt, jeweils ein Marker für neutrophile Granulozyten) keine γ H2AX-Foci nachgewiesen werden, was mit den vorherigen Daten einhergeht (Abb. 3.6 und 3.7).

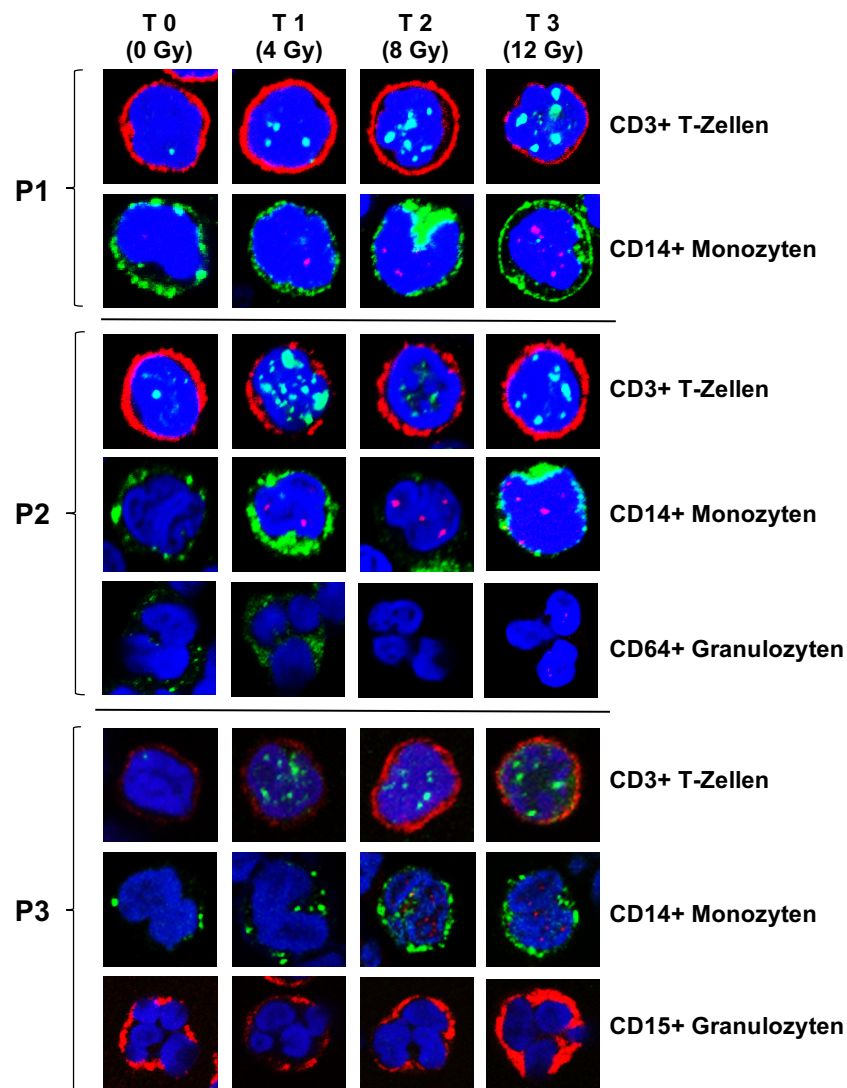


Abb. 3.11: γ H2AX-Färbung in T-Zellen, Monozyten und Granulozyten von Patienten (P1 - P3) während einer Ganzkörperbestrahlung. Persistierende γ H2AX-Foci in T-Zellen (CD3, rot; γ H2AX, grün) und Monozyten (CD14, grün; γ H2AX, rot), keine Foci in Granulozyten (CD64, grün; CD15, rot) detektierbar; Kern; blau.

Das Monozyten nach ionisierender Strahlung im Patient weniger γ H2AX-Foci zeigen als T-Zellen verdeutlicht nochmals eine Blutprobe von Patient 4, die unmittelbar nach der ersten Behandlungsdosis von 2 Gy entnommen wurde (Abb. 3.12). Auch direkt nach einer Exposition mit IR (2 Gy) zeigen CD3-positive T-Zellen (Oberflächenmarker rot, linkes Bild) deutlich stärkere γ H2AX-Signale als die restlichen Zellen, die morphologisch den Monozyten zuzuordnen sind („Bohnenform“ des Zellkerns). Die selbe Blutprobe wurde für CD14-positive Monozyten (Oberflächenmarker grün, rechtes Bild) angefärbt und zeigt auch hier mehr γ H2AX-Signale in nicht-oberflächenmarkierten Zellen (überwiegend T-Zellen) als in CD14 markierten Monozyten (Abb. 3.12). P4 wurde nicht in die Kinetik der Abb. 3.10 bzw 3.11 aufgenommen, da für diesen Patient keine weiteren Blutproben entnommen wurden.

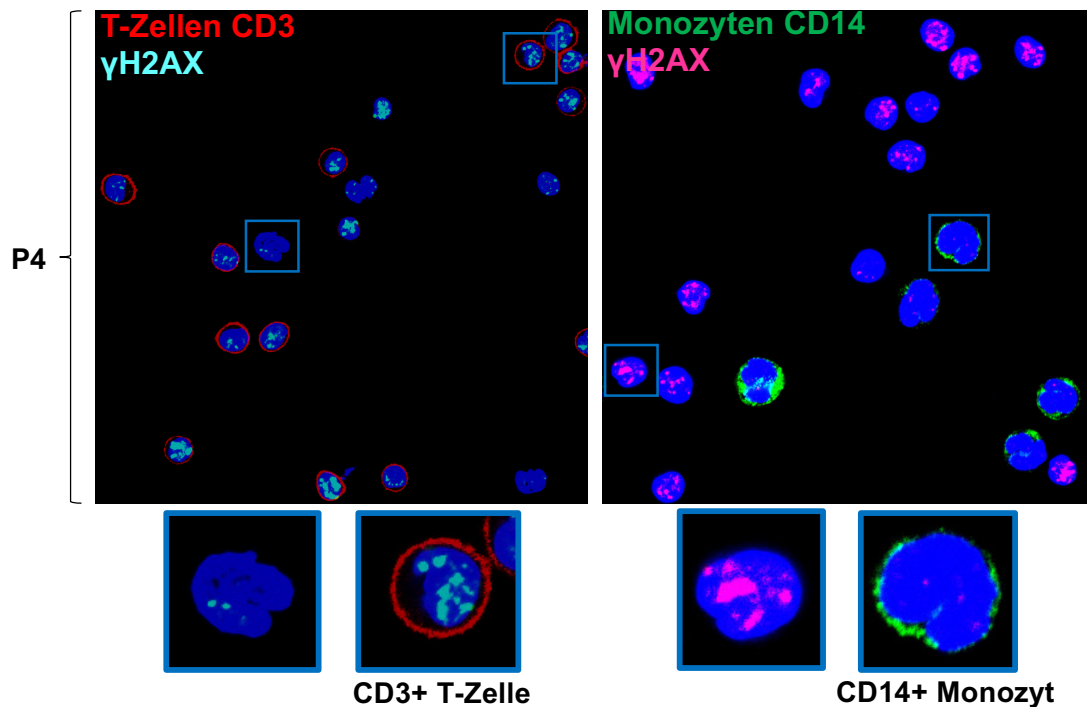


Abb. 3.12: γ H2AX-Färbung in CD3 markierten T-Zellen (links) und CD14 Monozyten (rechts) einer Blutprobe eines Patienten P4, entnommen direkt nach einer Ganzkörperbestrahlung von 2 Gy. Weitere Blutproben von P4 wurden im Verlauf der Ganzkörperbestrahlung nicht entnommen, da die Entnahme der Kontrollprobe (T0) nicht vorgenommen wurde.

Weiterhin wurde die Zellzahl von CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten am Durchflusszytometer gemessen (Abb. 3.13 A). Hier ist eine deutliche Abnahme der T-Zellen schon nach einem Tag (4 Gy kumulativ) zu erkennen. An T2 und T3 sind kaum T-Zellen im peripheren Blut des Patienten vorhanden. Dies stellt auch das Ziel der Ganzkörperbestrahlung in Form einer Depletion der Blutzellen dar. Diese Abnahme der Zellzahl macht auch eine quantitative Auswertung der Blutzellen an den Tagen 2 und 3 am LSM schwierig. Interessanterweise zeigen Monozyten an den Tagen T1 und T2 keine Abnahme der Zellzahl. Es ist sogar ein verhältnismäßiger Anstieg CD14-positiver Zellen zu erkennen. Dies kann auf mögliche Kompensationsmechanismen zurückzuführen sein und geht einher mit der geringeren Anzahl an DNA-Schäden in Monozyten im Vergleich zu T-Zellen. Erst an Tag 3 ist eine Abnahme an Monozyten sichtbar. Die Quantifizierung der Zellzahl von P3 ist in Abb. 3.13 B dargestellt.

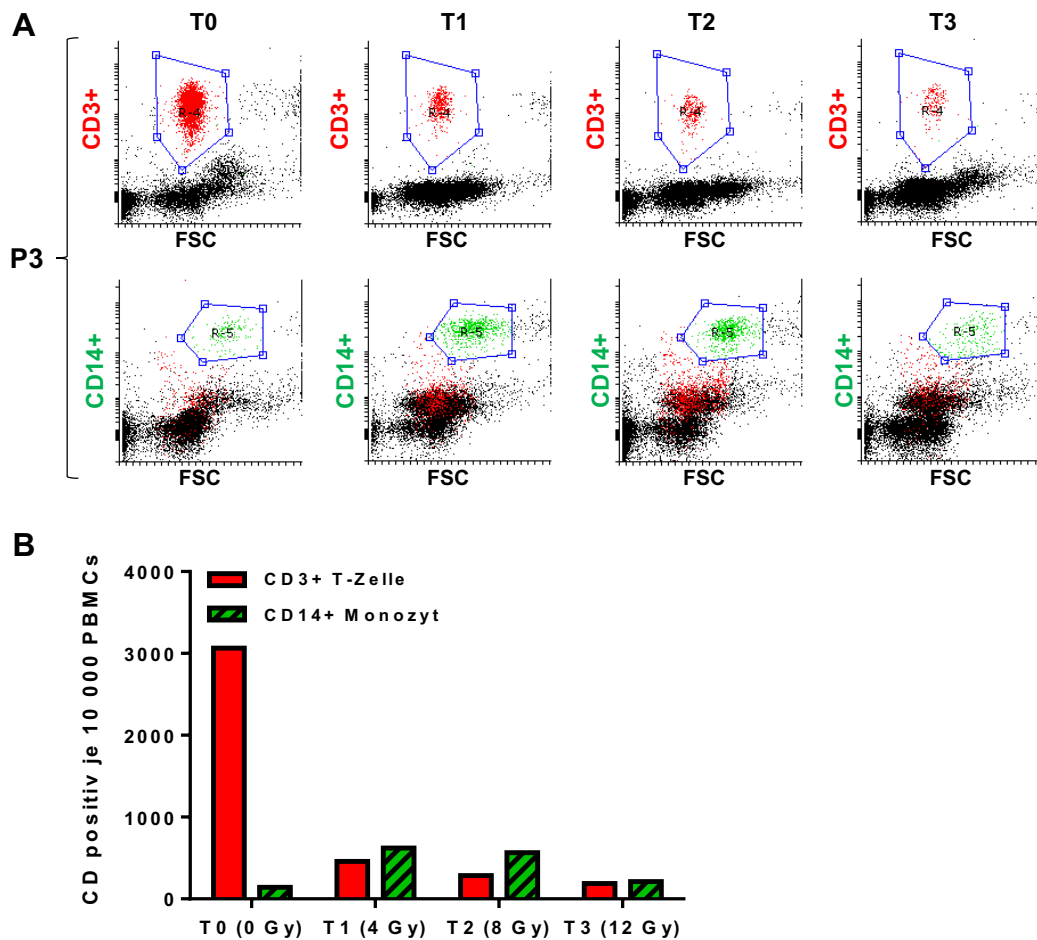


Abb. 3.13: A: Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl an CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten in PBMCs von P3. B: Die Quantifizierung von CD3+ bzw. CD14+ Zellen erfolgte in je 10^4 PBMCs am Durchflusszytometer.

Die relative Abnahme der T-Zellen sowie zwischenzeitliche Zunahme der Monozyten im Blut der bestrahlten Patienten konnte auch am LSM festgestellt werden (Abb. 3.14, P3 und ein weiterer Patient P5). Die Zahl der T-Zellen (rot) und Monozyten (grün) wurde innerhalb von 100 PBMCs per Auge gezählt. Während die T-Zellen eine deutliche Abnahme in der PBMC-Fraktion zeigen, steigt die relative Anzahl an Monozyten an (T2 in P3 bzw. T1 in P5), bevor sie wieder abfällt (T3 in P3 bzw. T2 in P5). Die relative Zunahme der Monozyten könnte auch in der Depletion von CD3+ T-Zellen begründet sein, da sie das Verhältnis der Blutzellen in PBMCs in Richtung Monozyten verschiebt.

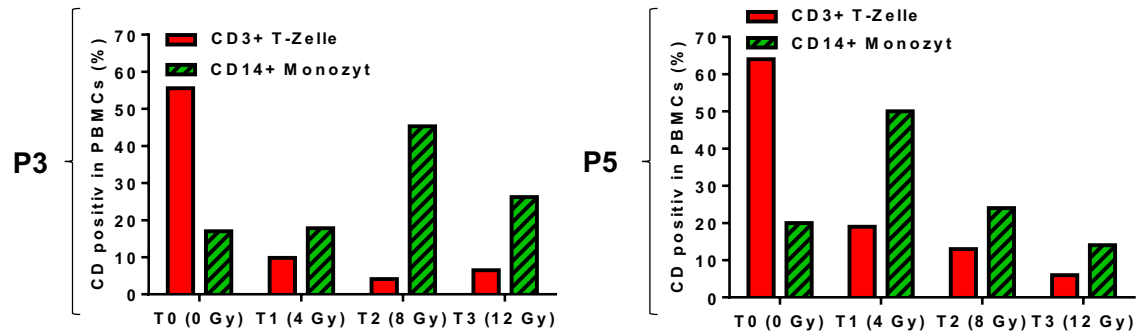


Abb. 3.14: Anzahl von CD3+ T-Zellen und CD14+ Monozyten im peripheren Blut von Patienten nach Ganzkörperbestrahlung. Es wurden je 100 Zellen in PBMCs bzgl. ihrer CD3- bzw. CD4-Positivität per Auge am LSM gezählt.

Die Depletion der Leukozyten in den Blutproben im Zeitraum der Bestrahlung erschwert eine quantitative Analyse von Zellen, vor allem bei Zellen, die im peripheren Blut nur in geringen Mengen vorhanden sind. So wurde zusätzlich eine γ H2AX-Färbung in CD19+ B-Zellen und CD56+ NK-Zellen durchgeführt (Abb. 3.15). B-Zellen zeigten während der Therapie einen sehr geringen Anstieg an γ H2AX-Foci bis T2 (ca. 2 Foci pro Zelle). An T3 konnten keine B-Zellen immunohistochemisch in der isolierten PBMC-Fraktion nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung von CD56+ NK-Zellen war aufgrund der starken Depletion CD56+ Zellen an T1 bis T3 sehr schwierig. So konnten an T1 bis T3 nur maximal 5 NK-Zellen (im Mittel 8 γ H2AX-Foci pro Zelle) auf dem Objektträger detektiert werden, wobei in der Kontrolle noch 36 NK-Zellen gezählt werden konnten.

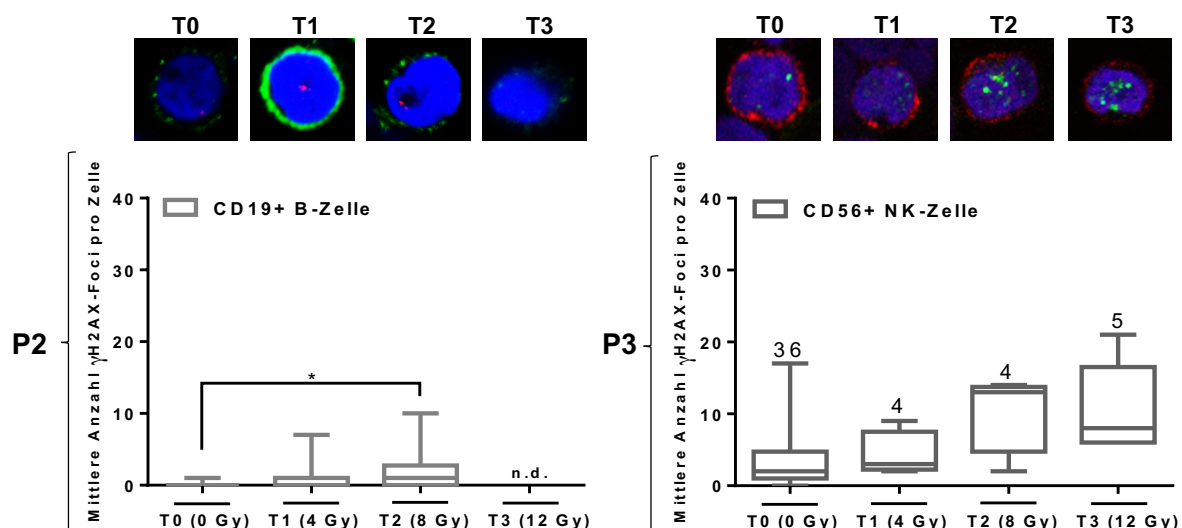


Abb. 3.15: Quantifizierung von γ H2AX-Foci am LSM in B-Zellen (CD19, grün; P2) und NK-Zellen (CD56, rot; P3) in Patienten während einer Ganzkörperbestrahlung. Repräsentative Bilder sind jeweils oberhalb der Graphen dargestellt. In P2 wurden jeweils 20 B-Zellen quantifiziert, an T3 konnten keine B-Zellen angefärbt werden (n.d. nicht definierbar) t-Test *p < 0,05. Die auf den Objektträgern ermittelbare Anzahl an NK-Zellen ist im Graph dargestellt. An T1 - T3 konnten nur maximal 4 - 5 NK-Zellen in den LSM Proben ermittelt werden. Eine statistische Aussage kann hier nicht getroffen werden.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität solcher Analysen in humanen Proben. Hier müssen auch Depletions-, und Kompensationsmechanismen des Körpers berücksichtigt werden. Diese werden in der Diskussion näher betrachtet.

Zusammengefasst zeigten T-Zellen einen deutlich stärkeren Abfall in der Zellzahl und deutlich mehr persistierende DNA-Schäden in Ganzkörper-bestrahlten Patienten als Monozyten.

3.6 Die Etablierung der Bluttropfenmethode zur Analyse von DNA-Schäden

Die oben dargestellten Experimente erforderten aufwendige Aufreinigungsmethoden von Blutzellen aus *Buffy Coat* oder größeren Blutmengen aus der Vene. Im Folgenden wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, DNA-Schäden (γ H2AX) in Blutzellen von nur einem Tropfen Blut aus der Fingerspitze zu ermitteln (Abb. 3.16). Eine solche Bluttropfenmethode (*Blood Drop Method*, BDM) für das Screening von DNA-Schäden könnte breite Anwendungsgebiete im Bereich gentoxischer Tests und Biodosimetrie innerhalb klinischer Therapien oder Feldstudien an Bevölkerungsgruppen erreichen, vereinfachen und revolutionieren.

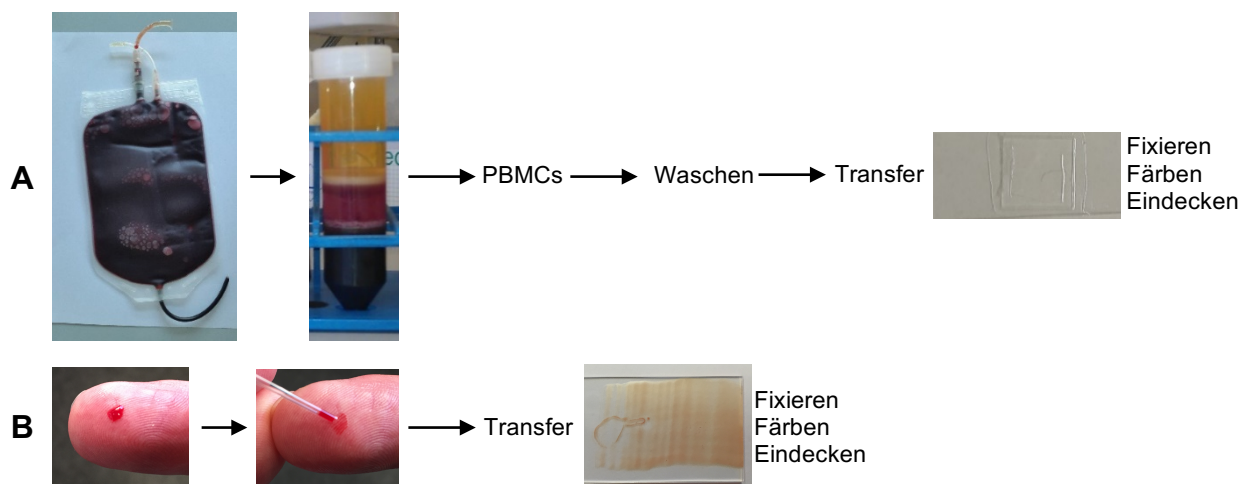


Abb. 3.16: Buffy Coat vs. BDM: Unterschiedliche Blutquellen für die γ H2AX-Färbung. **A:** Klassische Methode der PBMC-Aufreinigung über Ficoll-Dichtezentrifugation von *Buffy Coat*. Nach mehreren Waschschrten werden die PBMCs für die γ H2AX-Färbung auf ein Deckglas transferiert. **B:** Bei der Bluttropfenmethode wird das Blut aus der Fingerspitze nach mikro-invasivem Lanzetteneinsatz mit einer heparinisierten Glaskapillare aufgenommen und auf einen Mikroskop-Objektträger für die γ H2AX-Färbung ausgestrichen.

Zuerst wurde getestet, ob es möglich ist, DNA-Schäden in Blutzellen aus nur einem Tropfen peripheren Blutes qualitativ und quantitativ auszuwerten. Dabei sollte die Bluttropfenmethode mit der klassischen Ficoll-Methode bzgl. einer Färbung von γ H2AX verglichen werden. Die klassische Ficoll-Dichtezentrifugation benötigt größere Mengen an Blut (10 bis 50 ml) aus der Vene oder *Buffy Coat* sowie mehrere Waschzentrifugationsschritte. Dabei werden die

Blutzellen zusätzlichem, mechanischen Stress ausgesetzt. Die aufgereinigten PBMCs wurden auf ein Deckglas aufgetragen und γ H2AX nach dem etablierten Protokoll gefärbt (Abb. 3.16 A). Für die mikro-invasive BDM wurde die Fingerspitze mit einer Lanzette, wie sie Diabetiker verwenden, angestochen. Der Blutropfen wurde mit heparinisierten Glaskapillaren aufgenommen und auf ein Mikroskop-Objektträger für die anschließende γ H2AX-Färbung ausgestrichen (Abb. 3.16 B, Blutausstrich).

In Abb. 3.17 wird die etablierte γ H2AX-Färbung für unterschiedlich aufbereitete Blutproben am Metafer verglichen, um die BDM zu validieren. In Abb. 3.17 1 dargestellt sind PBMCs, die mit der klassischen Ficoll Methode aus *Buffy Coat* isoliert wurden (Abb. 3.16 A). Abb. 3.17 2 zeigt Zellen aus *Buffy Coat*, die nicht mit Ficoll aufgereinigt, aber mit Ammoniumchlorid-Lyse Puffer behandelt wurden, um die Erythrozyten zu entfernen (sog. Erythrolyse). Abb. 3.17 3 stellt Zellen eines Blutausstrichs von *Buffy Coat* ohne Erythrolyse dar und Abb. 3.17 4 zeigt Zellen, die über die BDM analysiert wurden (Abb. 3.16 B).

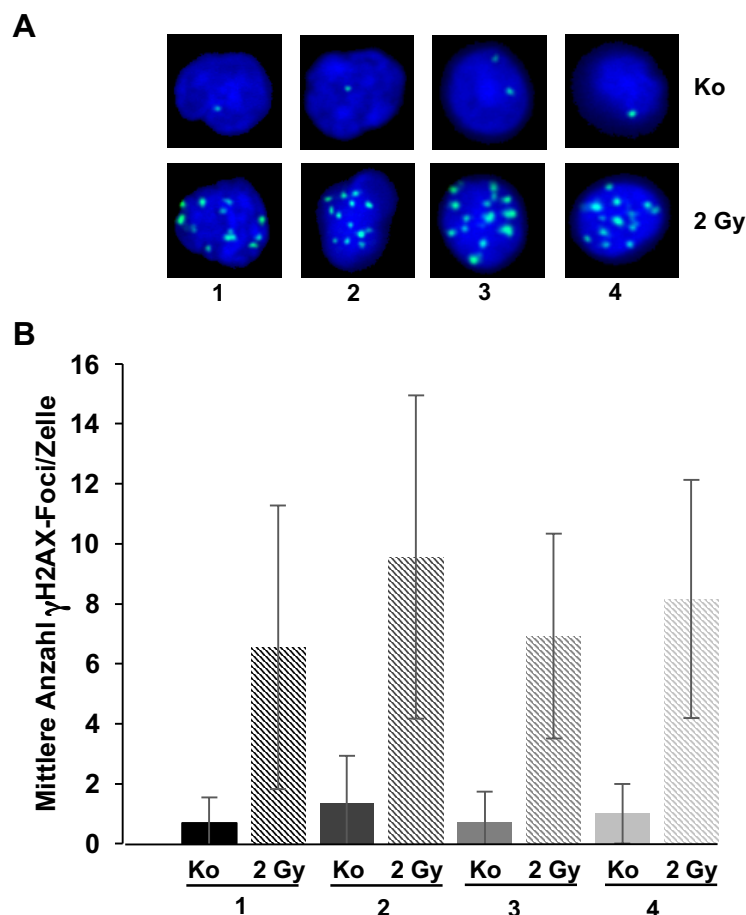


Abb. 3.17: Vergleich der γ H2AX-Färbung in unbehandelten (Ko) und bestrahlten (2 Gy) Blutzellen nach unterschiedlichen Methoden. **A:** Repräsentative Bilder von peripheren Blutzellen, analysiert am Metafer. 1, PBMCs nach Ficoll; 2, nach Erythrolyse von *Buffy Coat*; 3, Blutausstrich von *Buffy Coat* und 4, Blutausstrich von peripherem Blut aus der Fingerspitze (BDM). Die Fixierung erfolgte jeweils 1 h nach Bestrahlung. Kern, blau; γ H2AX, grün. **B:** Quantifizierung der am Metafer aufgenommenen Bilder. Ko = Kontrolle; Mittelwert aus bis zu 277 Zellen pro Probe. Fehlerbalken geben intraexperimentelle Variationen wieder.

PBMCs nach Ficoll-Isolation (1) bzw. Zellen aus *Buffy Coat* mit (2) oder ohne (3) vorheriger Erythrolyse wurden mit 2 Gy bestrahlt (IR) bzw. nicht bestrahlt (Ko) und bis zum Transfer bei 37°C im Inkubator gelagert. Zellen der BDM (4) wurden direkt nach Aufnahme in die heparinisierten Glaskapillaren innerhalb dieser bestrahlt und bis zum Ausstrich in diesen bei 37°C im Inkubator gelagert. 1 und 2 wurden auf das Deckglas transferiert bzw. 3 und 4 auf die Objektträger ausgestrichen, sodass die Fixierung der Zellen jeweils 1 h nach Bestrahlung erfolgen konnte.

Die Abb. 3.17 (A, repräsentative Bilder; B, Quantifizierung) zeigt, dass sich die Färbung von γ H2AX erfolgreich auf die BDM übertragen lässt. Es lassen sich in den Ausstrichen von *Buffy Coat* (3) und BDM (4) genügend Zellen für eine Quantifizierung anfärben. Die in den Ausstrichen in sehr hoher Menge enthaltenen Erythrozyten stören die Auswertung nicht, da sie ohne Zellkern nur als schwarzer Hintergrund erscheinen. Die einzelnen Lymphozyten sind in den Ausstrichen lediglich auf ein größeres Gebiet verteilt, was die Aufnahme und Auswertung der Bilder zeitlich verlängert. Die Anzahl an basalen DNA-Schäden in unbehandelten Zellen ist bei allen Methoden gering (Abb. 3.17 A und B Ko). Auch nach Exposition mit IR zeigen die Zellen bei allen Methoden eine vergleichbare Induktion von γ H2AX-Foci (Abb. 3.17 A und B).

Da es sich bei den Blutproben um Mischpopulationen handelt (hauptsächlich T-Zellen und Granulozyten, aber auch Monozyten und geringe Anteile an NK- und B-Zellen), wurden die Methoden 1 - 4 mit der γ H2AX-Foci Färbung für die konfokale Mikroskopie mit zusätzlicher Phänotypisierung des CD3 T-Zellrezeptors verglichen (Abb. 3.18). Auch hier war es möglich, die BDM zu verifizieren und erfolgreich den T-Zellrezeptor (rot) in Kombination mit γ H2AX (grün) anzufärben. Die Kontrollen zeigen in allen Aufarbeitungen 1 - 4 keine Foci, nach Bestrahlung in den angefärbten T-Zellen eine deutliche, von 1 - 4 vergleichbare Induktion an γ H2AX-Foci. Somit ist es auch mit der BDM möglich, DNA-Schäden spezifischen Blutpopulationen, wie hier der T-Zellen, zuzuordnen.

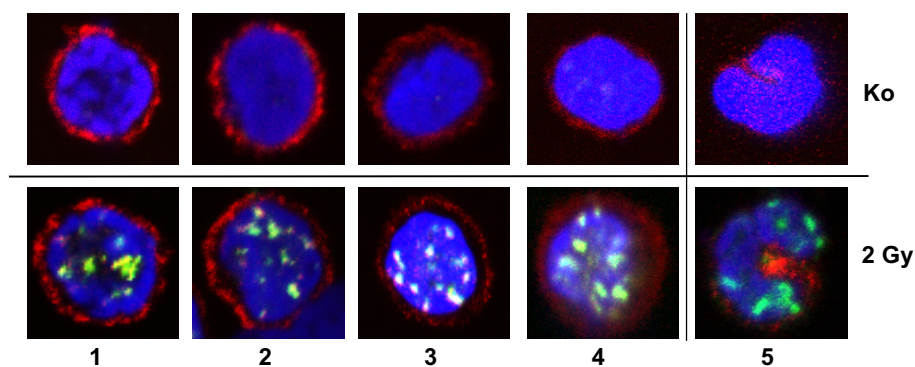


Abb. 3.18: Repräsentative Bilder (LSM) von DNA-Schäden (γ H2AX, grün) in Kombination mit dem T-Zellrezeptor (CD3, rot, 1 - 4) oder Monozytenrezeptor (CD14, rot, 5) in unbehandelten (Ko) oder bestrahlten (2 Gy) Blutzellen nach unterschiedlicher Aufarbeitung. 1, PBMCs nach Ficoll; 2, Erythrolyse *Buffy Coat*; 3, Ausstrich *Buffy Coat*; 4 und 5 Ausstrich BDM. Die Fixierung erfolgte jeweils 1 h nach Bestrahlung.

Neben Granulozyten sind auch CD14+ (rot) Monozyten, wenn auch in geringer Anzahl, im Ausstrich der BDM typisierbar (Abb. 3.18 5), was den Anwendungsbereich in der klinischen Diagnostik nochmals erweitert.

Insbesondere für epidemiologische Studien ist es wichtig zu wissen, wie lange der Blutausrich bis zur Analyse gelagert werden kann, ohne dass dabei die Möglichkeit einer Proteinfärbung verloren geht. Blutproben aus der Fingerspitze (BDM) wurden in den heparinisierten Glaskapillaren bestrahlt (2 Gy) oder nicht bestrahlt (Ko) und zeitlich so auf die Objektträger ausgestrichen, dass sie 1 h nach IR auf diesen eingetrocknet waren. Die getrockneten Blutausrich wurden entweder direkt danach (Tag 0) fixiert, CD3/ γ H2AX gefärbt und eingedeckt, oder 7 Tage bzw. 4 Wochen im Dunkeln bei Rt gelagert und danach fixiert und gefärbt. Die Proben wurden am konfokalen Mikroskop analysiert und γ H2AX-Foci in T-Zellen per Auge oder über die Messung der mittleren γ H2AX Intensität bestimmt (Abb. 3.19).

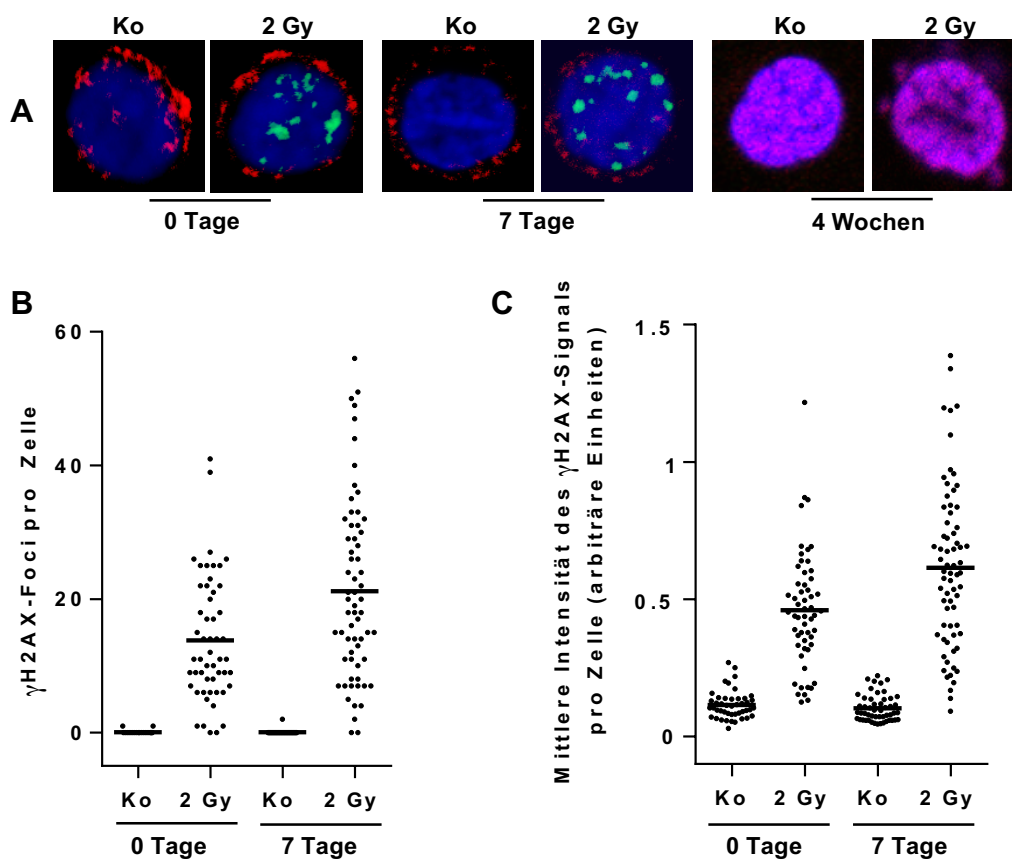


Abb. 3.19: DNA-Schäden (γ H2AX) in unbestrahlten und bestrahlten T-Zellen der BDM. Die Fixierung und Färbung der getrockneten Blutausrich erfolgte direkt an Tag 0 oder nach Lagerung an Tag 7 bzw. nach 4 Wochen. Die Proben wurden zeitgleich nach IR ausgestrichen, nach Trocknung aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten für γ H2AX und CD3 angefärbt. **A: 3D-Bilder (Z-Stacks), aufgenommen am konfokalen Mikroskop. CD3, rot; γ H2AX, grün; Kern, blau. **B:** Quantifizierung der Foci per Auge. **C:** Quantifizierung über die mittlere Intensität des Foci-Signals mit dem Programm *ImageJ*. Jeder Punkt repräsentiert eine ausgewertete Blutzelle. 42 - 64 Zellen je Probe.**

In Abb. 3.19 A sind 3D-Aufnahmen (Z-Stacks) von Zellen aus Blutausstrichen unterschiedlicher Lagerungszeit dargestellt. Auch 7 Tage nach Bestrahlung und Trocknung des Blutausstrichs konnten effizient der T-Zellrezeptor CD3 und γ H2AX angefärbt werden. Zellen in Ausstrichen, die 4 Wochen gelagert wurden, waren nicht mehr für CD3 und γ H2AX anfärbbar und wirkten degradiert bzw. ausgetrocknet. Die zeitliche Lagerung der Ausstriche ist also beschränkt.

Betrachtet man die Anzahl der γ H2AX-Foci pro T-Zelle und vergleicht die Auswertung 1 h vs. 7 Tage, so sind die jeweiligen Kontrollen als auch die mit γ -Strahlung exponierten Zellen untereinander vergleichbar (Abb. 3.19 B, Zählung per Auge; C, Messung der Intensität des γ H2AX-Signals pro Zelle). T-Zellen in 0 Tage gelagerten Ausstriche zeigten im Mittel 15 und 7 Tage gelagerte Ausstriche 21 γ H2AX-Foci pro Zelle.

Grundsätzlich ist eine Lagerung der Blutausstriche bis mindestens 7 Tage nach Exposition mit IR möglich, ohne einen Verlust bzw. Abbau von γ H2AX und des Oberflächenmarkers zu erhalten. Dies ermöglicht eine einfache und längere Lagerung sowie Transport von Proben weltweit. Zur Vollständigkeit wird noch erwähnt, dass Ausstriche, die 1 h nach Behandlung bzw. Trocknung direkt fixiert und erst 7 Tage später gefärbt und eingedeckt wurden, keine Signale des CD3 T-Zellrezeptors bzw. von γ H2AX zeigten (hier nicht gezeigt). Daher ist die Lagerung fixierter Ausstriche für eine später geplante Färbung nicht zu empfehlen.

Mithilfe der BDM können auch Kinetikstudien wie der zeitliche Verlauf und damit die Effektivität der DNA-Reparatur der Zellen durchgeführt werden. So wurde ein Tropfen Blut auf mehrere Glaskapillaren verteilt, diese mit 2 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgestrichen, fixiert und für CD3 und γ H2AX angefärbt (Abb. 3.20 A und B). Die BDM zeigte 1 h nach Bestrahlung eine signifikante Induktion von DNA-Schäden auf eine mittlere Anzahl von 19 γ H2AX-Foci pro T-Zelle, die nach 2 bis 4 h deutlich abnahmen und nach 8 h keine Signifikanz zur unbestrahlten Kontrolle zeigten. Somit ermöglicht die BDM auch zeitabhängige DNA-Reparaturstudien. Trägt man die relative Abnahme der γ H2AX-Foci gegenüber den 1 h Wert auf (= 1), so ist in T-Zellen der BDM nach 3 h eine Abnahme der IR-induzierten γ H2AX-Foci (Zählen per Auge) auf 50 % zu erkennen. Vergleicht man diese Kinetik mit T-Zellen angefärbt in PBMCs aus dem *Buffy Coat* (über die mittlere Intensität der Foci), so sieht man hier eine Abnahme auf 50 % nach ca. 4 h. Im Vergleich zu *Bead*-aufgereinigten T-Zellen aus PBMCs und der automatisierten Analyse am Metafer ist hier eine 50 %ige Abnahme der Foci nach ca. 6 h erkennbar. Je nach Aufarbeitung und Analysemethode schwanken die Werte der Abnahme der γ H2AX-Foci auf 50 % zwischen 3 und 6 h (Abb. 3.20 B). Dabei kann angenommen werden, dass die Abnahme des γ H2AX-Signals assoziiert ist mit der Reparatur von DSB.

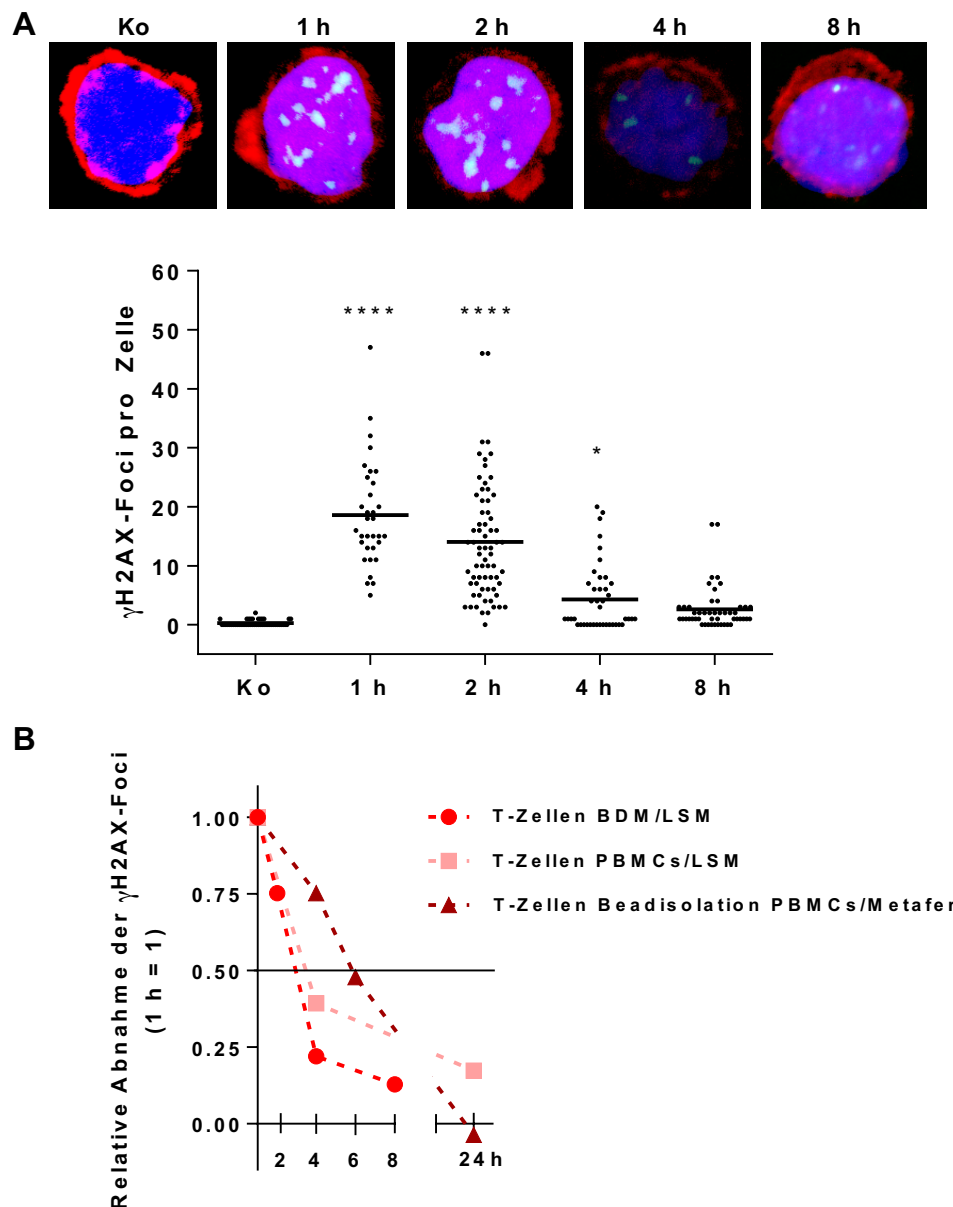


Abb. 3.20: DNA-Schäden in 2 Gy bestrahlten CD3⁺ T-Zellen aus der Fingerspitze (BDM) nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Fixierung (A). Vergleich von γ H2AX-Kinetiken in T-Zellen nach verschiedenen Methoden (B). A: Die Blutproben wurden in Glaskapillaren bestrahlt und bis zum Ausstrich bzw. Fixierung bei 37°C gelagert. Die Bilder zeigen Z-Stacks von DNA-Schäden (γ H2AX, grün) in T-Zellen (CD3, rot; Zellkern, blau), die am LSM aufgenommen wurden. Die Quantifizierung zeigt die signifikante, strahleninduzierte Zunahme von DNA-Schäden nach 1 h und eine zeitliche Abnahme bzw. Reparatur der Schäden bis 8 h nach IR. *One-Way ANOVA* (Dunnett), mehrfacher Vergleich zur Kontrolle * $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$. **B:** Auftragung der relativen γ H2AX-Foci Abnahme zum 1 h Wert (= 1) in T-Zellen im Vergleich von unterschiedlichen Methoden: T-Zellen gefärbt im peripheren Blut aus der Fingerspitze (BDM), analysiert am LSM; T-Zellen gefärbt in PBMCs aus *Buffy Coat*, analysiert am LSM; T-Zellen isoliert mit magnetischen *Beads* aus PBMCs von *Buffy Coat*, automatisiert analysiert am Metafer. Die γ H2AX-Abnahme ist assoziiert mit dem Ablauf der DNA-Reparatur.

Die BDM kann auch auf Mausversuche übertragen werden. So wurde die Schwanzvene einer Maus mit einem Skalpell angeritzt und der Blutropfen mit drei Glaskapillarröhrchen aufgenommen. Zwei Glaskapillaren wurden *ex vivo* mit 2 Gy bestrahlt und nach 1 h bzw. 4 h ausgestrichen, fixiert und CD3/ γ H2AX gefärbt, die dritte diente als Kontrolle (Abb. 3.21 A). Es

konnten effizient CD3 T-Zellen der Maus angefärbt und die Reparatur der DNA-Schäden bis 4 h nach IR am konfokalen Mikroskop quantifiziert werden (im Mittel pro T-Zelle 20 γ H2AX-Foci nach 1 h, 5 γ H2AX-Foci nach 4 h). Des Weiteren kann die BDM an Mäusen angewendet werden, die mit gentoxischen Agenzien wie dem Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) behandelt wurden. Dies ermöglicht Analysen von gentoxischen Effekten einer Chemotherapie auf murine Blutzellen. Einer Maus wurde i.p. 200 mg/kg TMZ gespritzt, die Kontrollmaus mit DMSO behandelt. Das Blut wurde über Herzpunktion 16 h nach Behandlung entnommen, in die Glaskapillaren überführt und nach der BDM aufgearbeitet (Abb. 3.21 B). 16 h nach Gentoxizitätsbehandlung mit TMZ konnte eine Induktion von DNA-Schäden in murinen T-Zellen detektiert werden (11 γ H2AX-Foci als Mittelwert pro T-Zelle).

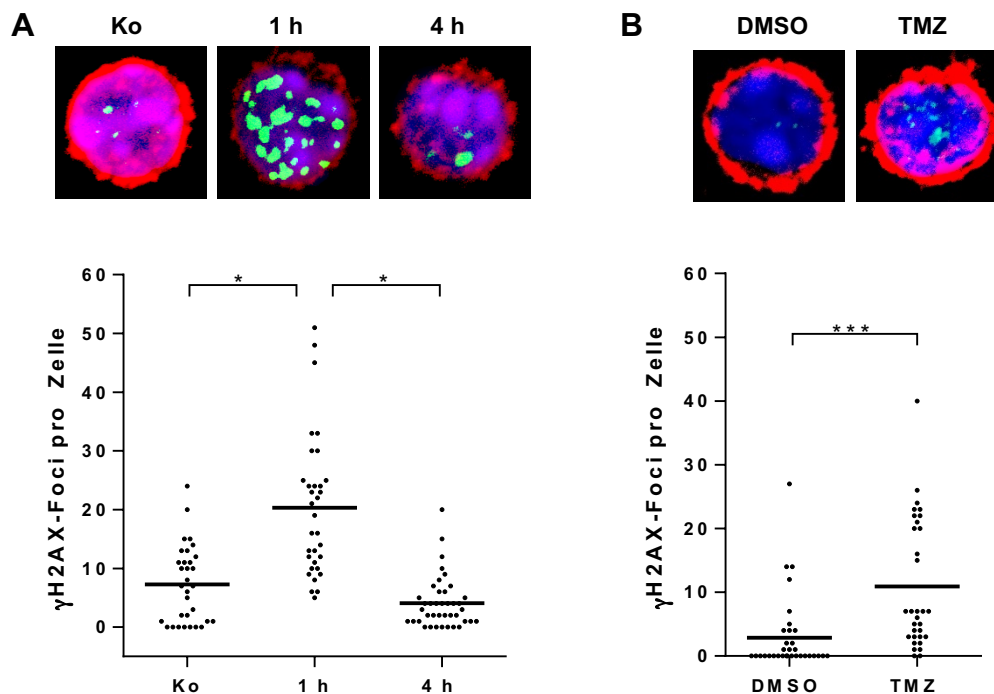


Abb. 3.21: Die BDM im Mausversuch. **A:** Zeitkinetik von IR-induzierten DNA-Schäden in CD3 T-Zellen der Maus. Blut wurde nach Punktion der Schwanzvene in Glaskapillaren aufgenommen, mit 2 Gy *ex vivo* bestrahlt und nach 1 bis 4 h ausgestrichen, fixiert und gefärbt. One-Way ANOVA (Dunnett), mehrfacher Vergleich zum 1h Wert * $p < 0,01$ **B:** γ H2AX-Foci 16 h nach Behandlung der Maus mit 200 mg/kg TMZ bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle. Das Blut wurde über eine Herzpunktion entnommen. t-Test, *** $p < 0,001$.

Zuletzt sollte mittels BDM überprüft werden, ob es möglich ist, auch andere Proteine der DNA-Schadensantwort zu analysieren. Dies würde die Anwendungsmöglichkeit der BDM in der Diagnostik erheblich erweitern. So konnten in T-Zellen nach BDM Proteine angefärbt werden, die nach DNA-Schäden an diese rekrutiert und phosphoryliert werden (Abb. 3.22). Die BDM ermöglichte es, in T-Zellen die phosphorylierte Form des „DNA-Schadensensors“ ATM (pATM) und dessen Substrat KAP1 (phosphorylierte Form pKAP1), ein die DNA-Reparatur koordinierendes und im Heterochromatin befindliches Protein, in bestrahlten Proben zu

detektieren (Abb. 3.22). Auch die Rekrutierung von 53BP1 (*p53-binding protein*), ein wichtiger Faktor der NHEJ, an den DNA-Schaden ist über die BDM nachweisbar. Zugleich konnte eine Induktion von RPA (*replication protein A*), das einzelsträngige DNA-Bereiche bindet, mittels BDM sichtbar gemacht werden. Da RPA auch basal in Zellen vorliegt, zeigte das Protein auch Signale in der Kontrolle. 53BP1 und RPA zeigten auch Signale außerhalb des Zellkerns und lässt auf eine zusätzliche Akkumulation der Proteine im Zytoplasma oder in den Mitochondrien schließen.

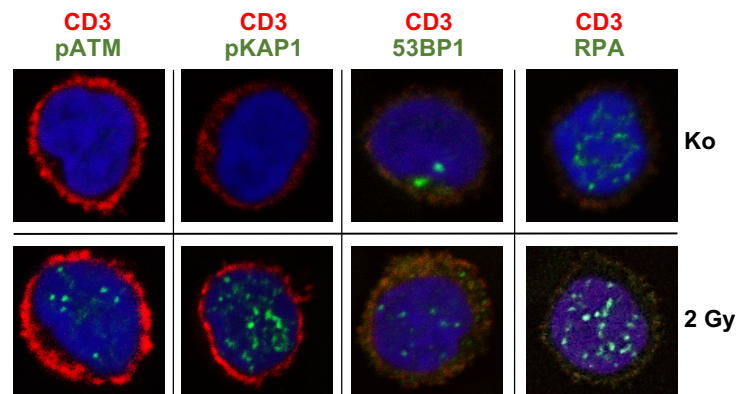


Abb. 3.22: Detektion von Proteinen der DNA-Schadensantwort in T-Zellen (CD3, rot; Kern, blau) mittels BDM in unbehandelten (Ko) bzw. 2 Gy bestrahlten Proben: phosphoATM, phosphoKAP1, 53BP1 und RPA (grün).

Die Ergebnisse zeigen, dass die BDM sensitiv genug ist und aus einem Tropfen Blut eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen liefert, um in Blutzellen qualitativ und quantitativ verschiedene Proteine der DDR während einer therapeutischen Intervention (IR oder DNA-schädigende, gentoxische Stoffe) zu untersuchen.

3.7 Auswirkung der Stimulation des CD3 T-Zellrezeptors und CD28 Ko-Rezeptors auf die Morphologie von T-Zellen

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen zu den strahlensensitivsten Zellen des Immunsystems gehören, und auch in der Biodosimetrie nach Exposition mit IR (BDM) den adäquatesten Zelltyp für die Diagnostik darstellen. Im Folgenden wird die Strahlensensitivität der T-Zellen (PBLs) näher betrachtet. Dabei wurden unstimulierte mit CD3- und CD28-stimulierten T-Zellen verglichen.

Stimulierte T-Zellen stellen den Zustand einer aktiven Zelle während einer Entzündung oder Pathogen-Abwehrreaktion. Aktivierung des CD3 und CD28 Rezeptors (stim) führt zu einer deutlichen Vergrößerung der T-Zelle im Vergleich zur nicht aktivierten (unstim) T-Zelle (Abb. 3.23 A, aufgenommen am LSM; CD3, rot; Kern, blau). Dies ist auch in lichtmikroskopischen

Aufnahmen sichtbar (Abb. 3.23 B). Unstimulierte Lymphozyten sind klein, rund und zeigen durchweg ähnliche Zellgrößen. Stimulierte Zellen sind größer, erscheinen aufgebläht und bilden kleine Inseln unterschiedlicher Zellgröße in der Zellkulturplatte. Die enorme Vergrößerung der stimulierten Zellen auf das Doppelte ist auch am SSC/FSC im Durchflusszytometrie zu erkennen (Abb. 3.23 C). Dabei gibt der Anstieg innerhalb des SSC eine durch die Stimulation resultierende Zunahme der Zellgranularität und innerhalb des FSC eine Zunahme der Zellgröße wieder.

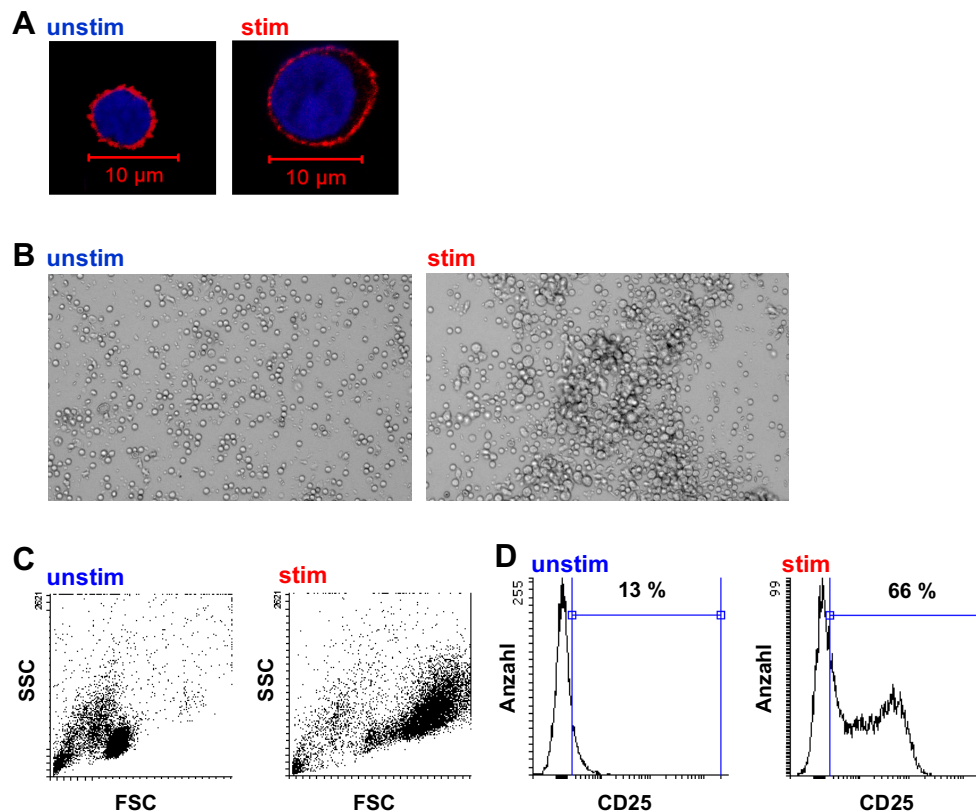


Abb. 3.23: Vergleich der Zellmorphologie CD3/CD28-unstimulierter vs. -stimulierter Lymphozyten (PBLs).

A: Bilder, aufgenommen am konfokalen Mikroskop, CD3, rot; Kern, blau. **B:** Lichtmikroskopische Aufnahmen. **C:** SSC/FSC (Durchflusszytometrie) **D:** Expression des Markers CD25 in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs), Histogramme (Durchflusszytometrie).

Da der CD25 Marker (IL-2 Rezeptor) insbesondere auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (dieser wird auch zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen verwendet, unabhängig von ihrer Aktivierung) wurde in Abb. 3.23 D der CD25 Marker in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten mittels Durchflusszytometer untersucht. Stimulierte Lymphozyten zeigten auch hier einen deutlichen Anstieg CD25-positiver Zellen. Betrachtet man die Zellzyklusverteilung (Abb. 3.24), so befinden sich unstimulierte T-Zellen ausschließlich in der G0 bzw. G1 Phase. Periphere Blutzellen liegen somit nach der Isolation bzw. im *Buffy Coat* gesunder Spender nicht aktiviert bzw. in einem nicht proliferierenden Zustand vor. Nach 2-tägiger Stimulation der

Lymphozyten beginnen die Zellen sich zu teilen bzw. zu proliferieren, was sich in einem Anstieg an S und G2 Phase Zellen bestätigen lässt. Vergleicht man unstimulierte mit stimulierten Zellen, so betrachtet man nicht nur Zellen unterschiedlicher metabolischer Aktivität aufgrund der T-Zellaktivierung, sondern vergleicht auch nicht-proliferierende vs. proliferierende Zellen.

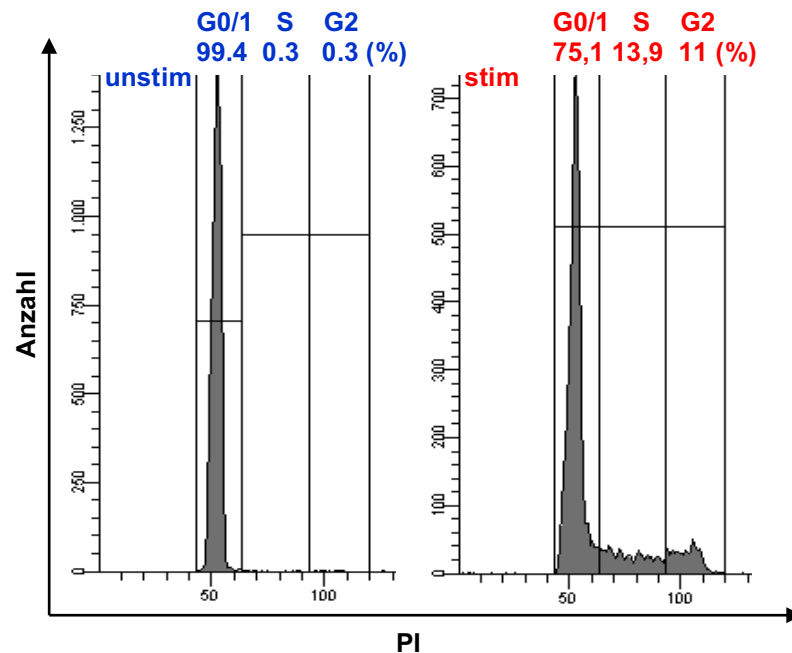


Abb. 3.24: Zellzyklusverteilung unstimulierter vs. CD3/CD28-stimulierter Lymphozyten. Die Zellen wurden nach Ernte und Fixierung mit PI gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

3.8 Strahlensensitivität unstimulierter vs. stimulierter Lymphozyten

Die stimulierten bzw. nicht-stimulierten Lymphozyten wurden mit unterschiedlichen Dosen IR behandelt und 24 h später wurde der Zelltod gemessen (Abb. 3.25 A). In der PBL-Population wurden zusätzlich Th und CTL angefärbt. Die in Abb. 3.25 A dargestellten unstimulierten Zellen sind auch in Abb. 3.1 gezeigt und wurden hier ihrem stimulierten Anteil gegenübergestellt. Die Daten zeigen, dass eine CD3-/CD28-Stimulation von Lymphozyten signifikant vor strahleninduziertem Zelltod schützt. Sowohl PBLs als auch die darin markierten Th und CTL zeigten signifikant geringere IR-induzierte Zelltodraten, wenn sie zuvor stimuliert wurden (Abb. 3.25 A). Die Strahlenprotektion war bei sehr geringen (0,125, 0,25 und 0,5 Gy) und hohen Dosen (1 und 2 Gy) γ -Strahlung sichtbar (PBLs: 0,25 Gy, von 30 auf 5 %; 1 Gy, von 45 auf 11 % induzierter Zelltod).

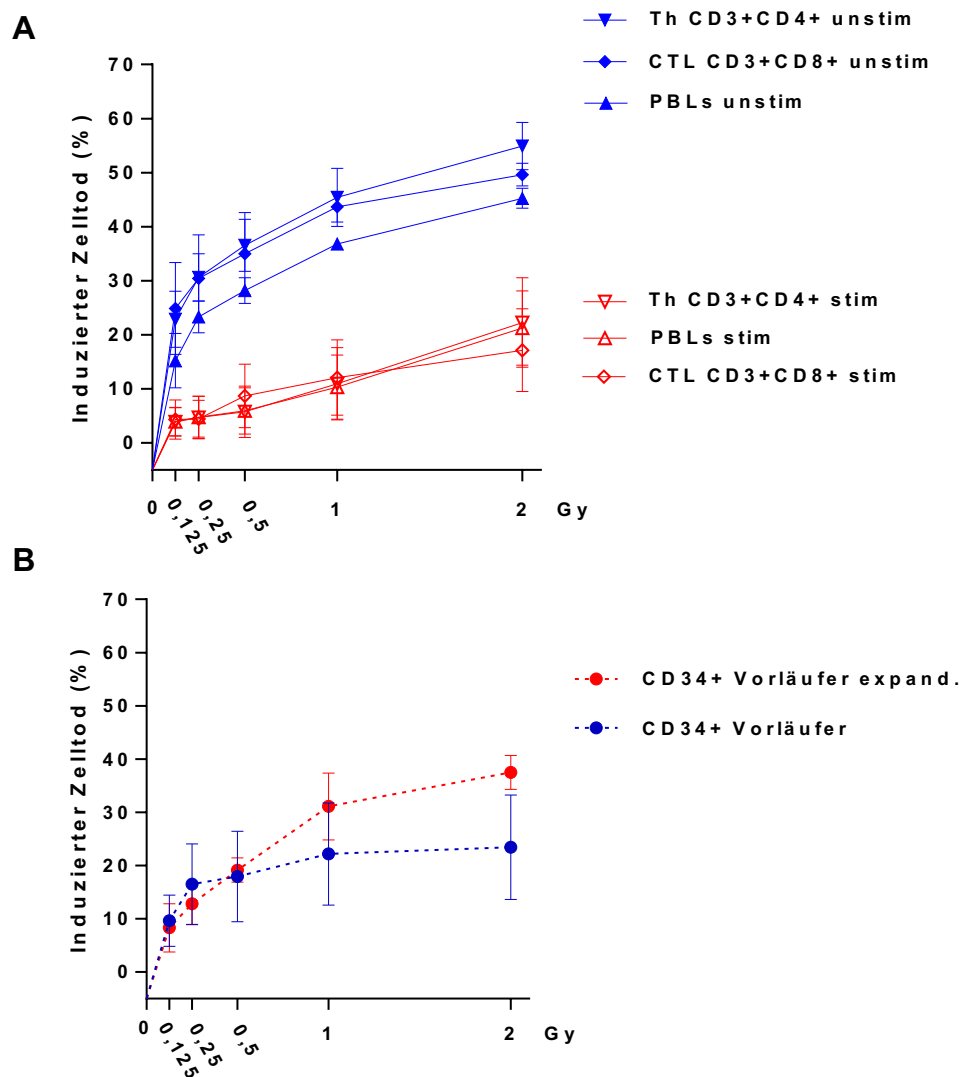


Abb. 3.25: Vergleich der Induktion der Apoptose (AnnexinV) von unstimulierten und stimulierten peripheren Blutzellen (A) bzw. CD34+ Vorläuferzellen (B) 24 h nach unterschiedlichen Dosen IR. CD3+CD4+ Th und CD3+CD8+ CTL wurden in der PBL-Population markiert und ausgewertet. Eine Stimulation führt zur signifikanten Reduktion des strahleninduzierten Zelltodes in T-Zellen. Dieser protektive Effekt war nicht in aktivierten CD34+ Vorläuferzellen (expand.) zu erkennen. t-Test, signifikante Unterschiede *PBLs unstim - PBLs stim (0,25/0,5/1/2 Gy), *Th unstim - Th stim (0,125/0,25/0,5/1/2 Gy), *CTL unstim - CTL stim (0,25/1/2 Gy), *p < 0,05, Mittelwert, SD n = 3.

Interessanterweise ist eine solche Protektion gegenüber IR nicht in aktivierten und proliferierenden CD34+ Vorläuferzellen (expand.: kultiviert in speziellem Expansionsmedium) zu erkennen (Abb. 3.25 B, auch in Abb. 3.1 dargestellt). Dieser protektive Effekt der Stimulation scheint spezifisch für Lymphozyten bzw. für den T-Zellrezeptor zu sein.

Der schützende Effekt der Stimulation konnte auch in CTL, Th und Treg nachgewiesen werden, die vor Stimulation und Bestrahlung mit magnetischen *Beads* isoliert wurden (Abb. 3.26; im Anhang Abb. 6.5). Auch hier wurden die nicht-stimulierten T-Zellen aus Abb. 3.4 B mit ihrem stimulierten Gegenpart verglichen (im Anhang Abb. 6.6, Zellzyklusanalyse). Th und Treg zeigten nach CD3/CD28-Stimulation signifikant weniger strahleninduzierten Zelltod nach

0,5 und 1 Gy. Demnach sieht man bei Th nach 1 Gy eine Reduktion des induzierten Zelltods von 38 auf 17 %, bei Treg eine Reduktion von 24 auf 13 %. Für stimulierte CTL konnte lediglich eine Tendenz einer geringeren Zelltodinduktion festgestellt werden, da die Experimente eine erhöhte Varianz aufwiesen.

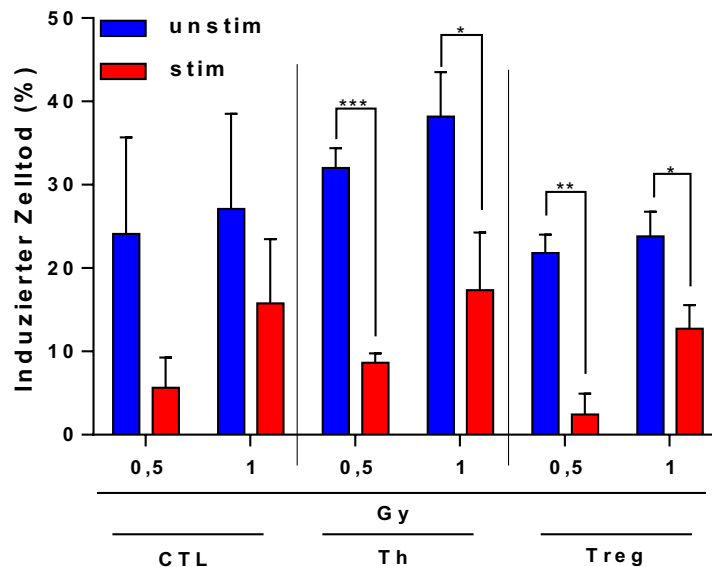


Abb. 3.26: Vergleich der Zelltodinduktion (AnnexinV) von aufgereinigten und unstimulierten bzw. stimulierten CTL, Th und Treg 72 h nach Bestrahlung mit 0,5 und 1 Gy. t-Test, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Mittelwert, SEM, n = 3.

Um zu untersuchen, ob die Zellen nach IR in Apoptose oder Nekrose untergehen, wurden AnnexinV/PI Färbungen durchgeführt. Die Abb. 3.27 (im Anhang Abb. 6.8) zeigt die strahleninduzierte Apoptose und Nekrose nach verschiedenen Zeitpunkten (6 bis 72 h) in unstimulierten (u) und stimulierten (s) PBLs nach einer Bestrahlung von 1 Gy. 6 h nach 1 Gy waren noch keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten PBLs in der Zelltodinduktion erkennbar. 12 h nach IR wurde in unstimulierten PBLs bereits signifikant mehr Apoptose als in stimulierten PBLs induziert. Der strahleninduzierte Zelltod wird somit innerhalb des sehr kurzen Zeitraums von 6 bis 12 h eingeleitet. Stimulierte PBLs zeigten auch 24, 48 und 72 h nach 1 Gy signifikant geringere Mengen induzierter apoptotischer Zellen als unstimulierte PBLs. Der induzierte Zelltod (Apoptose + Nekrose) in unstimulierten PBLs steigt innerhalb von 72 h auf ~ 56 %, in stimulierten PBLs nur auf 26 % an. Eine Zunahme nekrotischer Zellen war ab 24 h zu erkennen, insgesamt jedoch deutlich geringer als apoptotische Zellen.

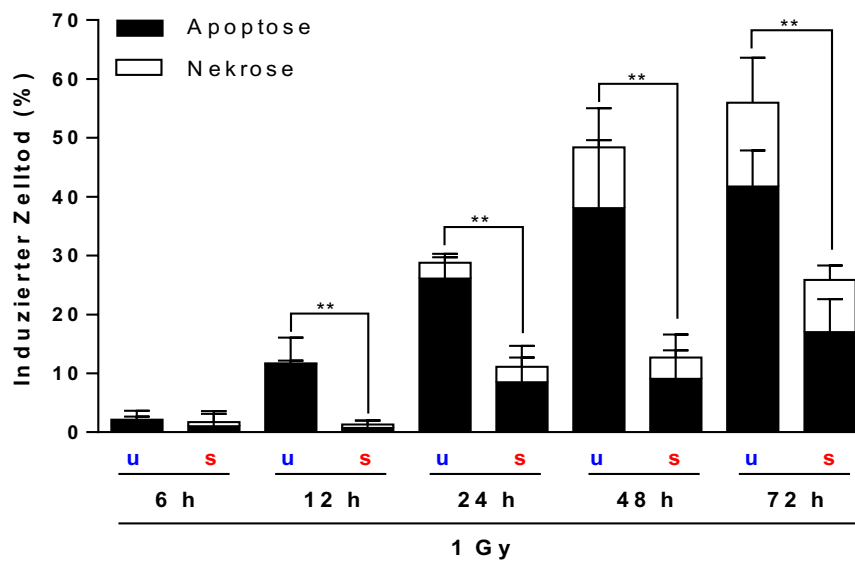


Abb. 3.27: Induzierte Apoptose und Nekrose in unstimulierten vs. stimulierten Lymphozyten nach 1 Gy zu unterschiedlichen Zeitpunkten. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. t-Test (apoptotischer Anteil), **p < 0,01. Mittelwert, SD, n = 3 - 4.

Ein weiterer Endpunkt der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA. Diese wurde mittels SubG1 Messung ermittelt. Abb. 3.28 zeigt, dass unstimulierte PBLs 24 h nach 1 Gy mehr DNA-Fragmente bilden als stimulierte PBLs, was sich in einer Erhöhung des SubG1-Peaks manifestiert. Die Abb. 3.28 A stellt repräsentative Histogramme im direkten Vergleich beider Populationen dar, B ist die Quantifizierung der SubG1-Induktion von n = 3.

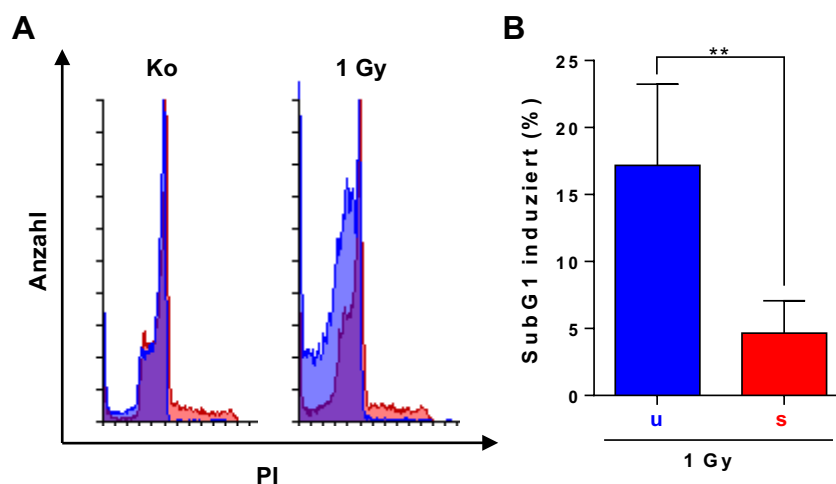


Abb. 3.28: SubG1 Messung in unstimulierten und stimulierten PBLs 24 h nach 1 Gy. **A:** Repräsentative Histogramme der SubG1 Färbung (PI) in Kontrolle (Ko) und 1 Gy bestrahlten PBLs. blau, unstim; rot, stim. **B:** Quantifizierung der strahleninduzierten SubG1 Fraktion als Zeichen der DNA-Fragmentierung aus drei unabhängigen Versuchen. t-Test, ** p < 0,01, Mittelwert, SD, n = 4.

Generell zeigten Lymphozyten nach IR eine vermehrte Induktion von Apoptose, weniger von Nekrose, sowie eine strahleninduzierte DNA-Fragmentierung. Weiterhin bewirkte eine Aktivierung der T-Zellrezeptoren CD3 und CD28, ein typischer Prozess der T-Zell Immunantwort, einen signifikanten Schutz gegenüber IR-induzierten Zelltod.

3.9 Untersuchung der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen und -Einzelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten

Um zu untersuchen, warum unstimulierte PBLs sensitiver gegenüber IR als stimulierte PBLs sind, wurden zuerst die durch Strahlung vermittelten DNA-Schäden und die Reparaturkapazität beider Populationen verglichen. Mit Hilfe des alkalischen *Comet Assays* werden hauptsächlich SSB, aber auch DSB und alkalische-labile Stellen nachgewiesen. Die Abb. 6.9 (im Anhang) zeigt die Induktion von SSB 1 min nach unterschiedlichen Dosen von γ -Strahlung. 5 Gy zeigte den deutlichsten Anstieg der Schweife und wurde für die folgenden Kinetikstudien verwendet. Schaut man sich die Induktion der SSB in unstimulierten und stimulierten PBLs an, so zeigten stimulierte PBLs in der Tendenz direkt nach 5 Gy eine höhere Anzahl an SSB (0 h Wert entspricht DNA-Schäden direkt nach IR), dies war jedoch nicht signifikant (Abb. 3.29, A, Quantifizierung; B, repräsentative Bilder). Die Reparatur bzw. zeitliche Abnahme der DNA-Schäden war in beiden Populationen deutlich erkennbar und in der Reduktion der Kometenschweife sichtbar. 1 h nach Exposition mit 5 Gy näherten sich die DNA-Schäden dem basalen Wert der Kontrolle an. Nach 2 bzw. 4 h konnten keine DNA-Fragmente in Form eines Schweifs mehr nachgewiesen werden, was auf eine vollständige Reparatur der SSB schließen lässt.

DSB wurden anhand des Neutralen *Comet Assays* nachgewiesen. Abb. 3.30 A und B zeigen, dass in der Induktion der DSB und auch in der Reparatur der Schäden keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten vorliegen. Nach 120 bzw. 240 min waren die DSB vollständig repariert.

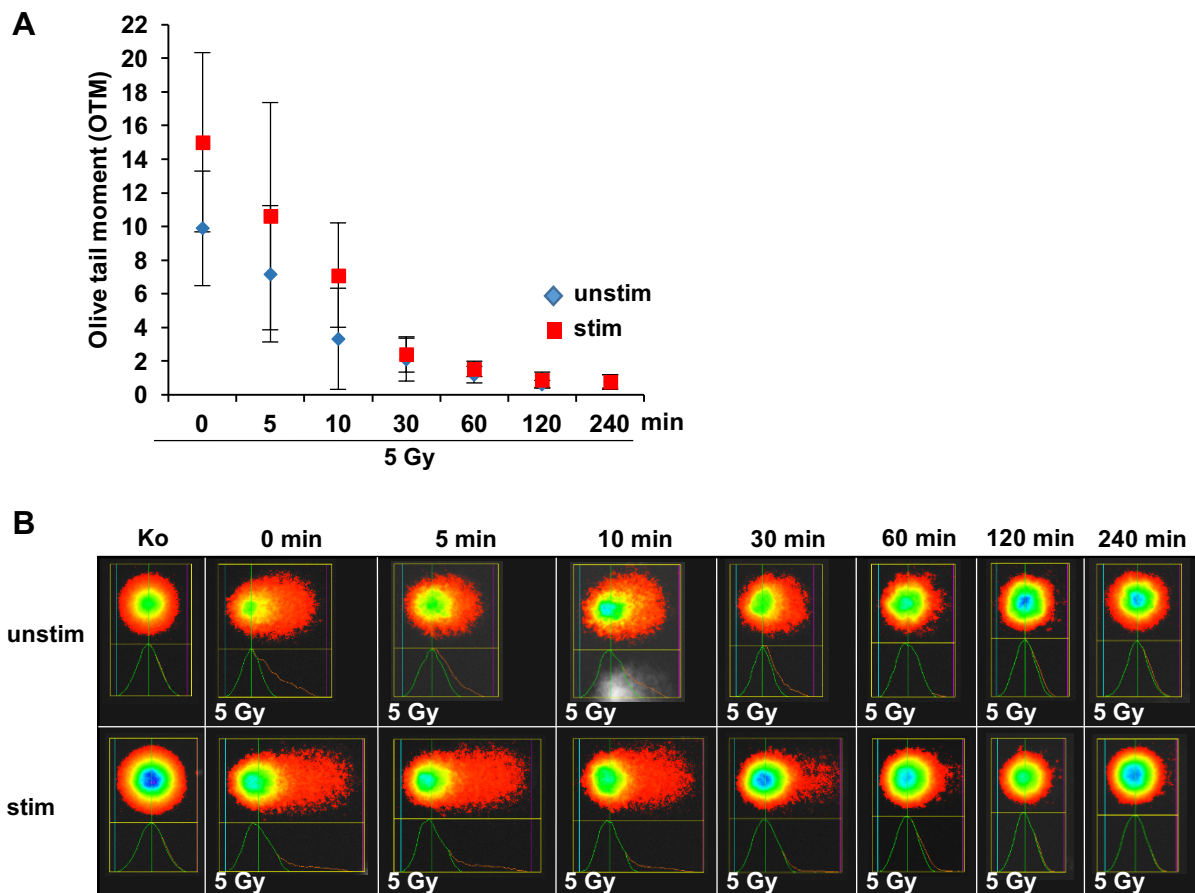


Abb. 3.29: Alkalischer Comet Assay zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten. **A:** Quantifizierung der Reparaturkinetik dreier unabhängiger Experimente nach Exposition mit 5 Gy und unterschiedlichen Zeitpunkten. Mittelwert, SD, $n = 3$. **B:** Repräsentative Bilder der Kometenschweife. Ko, unbestrahlt; 0 - 240 min nach 5 Gy IR.

Jedoch erscheint die zeitliche Reduktion der DSB in den Lymphozyten verzögerter abzulaufen als die Reduktion der SSB (Abb. 3.29). Generell reparierten Lymphozyten die durch IR-induzierten SSB und DSB effizient. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten festgestellt werden.

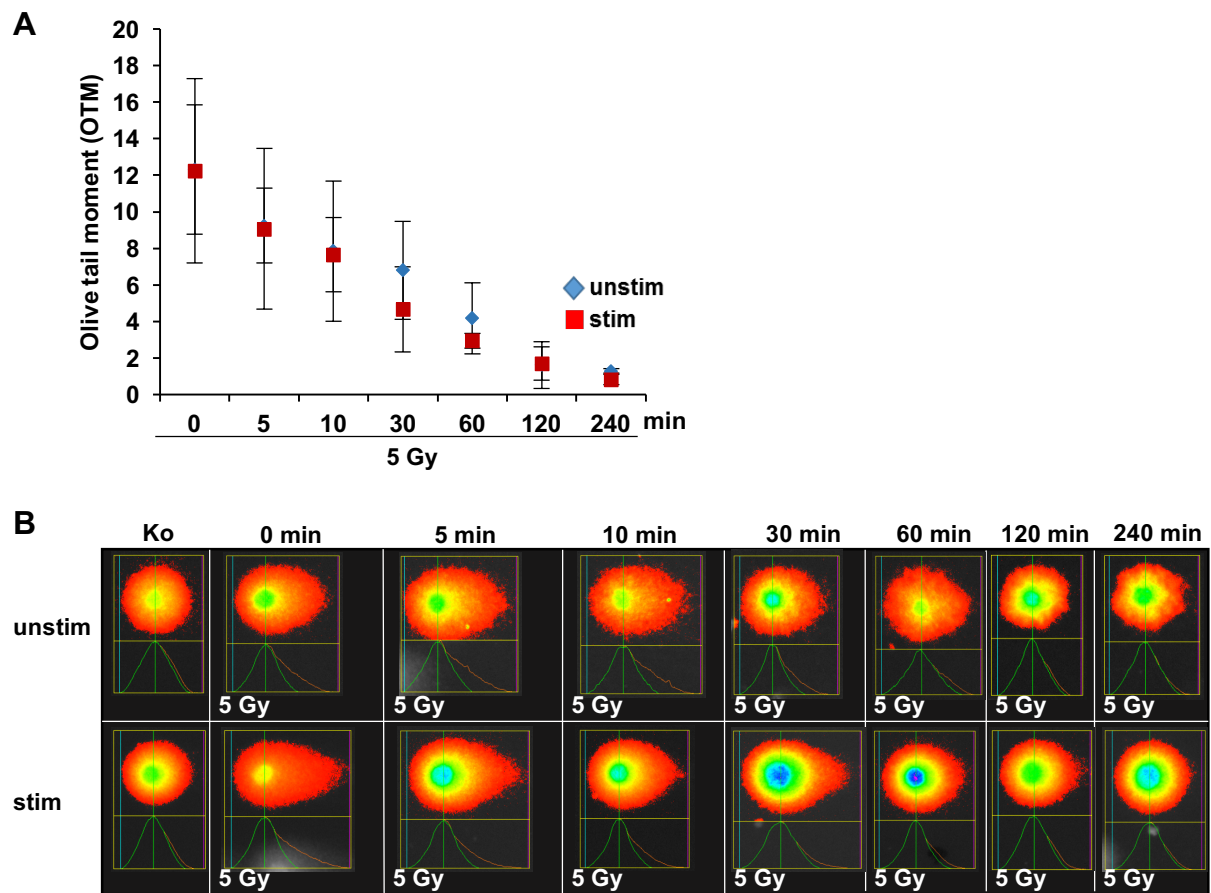


Abb. 3.30: Neutraler Comet Assay zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten. **A:** Quantifizierung der Reparaturkinetik dreier unabhängiger Experimente nach Exposition mit 5 Gy und unterschiedlichen Zeitpunkten. Mittelwert, SD, $n = 3$. **B:** Repräsentative Bilder der Kometenschweife. Ko, unbestrahlt; 0 - 240 min nach 5 Gy IR.

3.10 Expression und Induktion von p53 und des FasR nach IR

Nach der Induktion von DNA-Schäden wird das für seine multiplen Funktionen bekannte p53 aktiviert. Dieses kann je nach Phosphorylierung Zelltod, DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest oder auch Zellüberleben einleiten (Oren, 2003; Canman et al., 1998). Abb. 3.31 A zeigt die p53 Induktion in Lymphozyten 6 bzw. 24 h nach 1 Gy Bestrahlung. In beiden Populationen wurde nach 6 h p53 induziert und war auch 24 h nach Exposition mit 1 Gy in den Zellen nachzuweisen. p53 wurde basal auch in unbehandelten (Ko), stimulierten Lymphozyten exprimiert. Die Aktivierung von CD3 und CD28 induzierte somit in Lymphozyten p53, unabhängig von einer Behandlung mit γ -Strahlung.

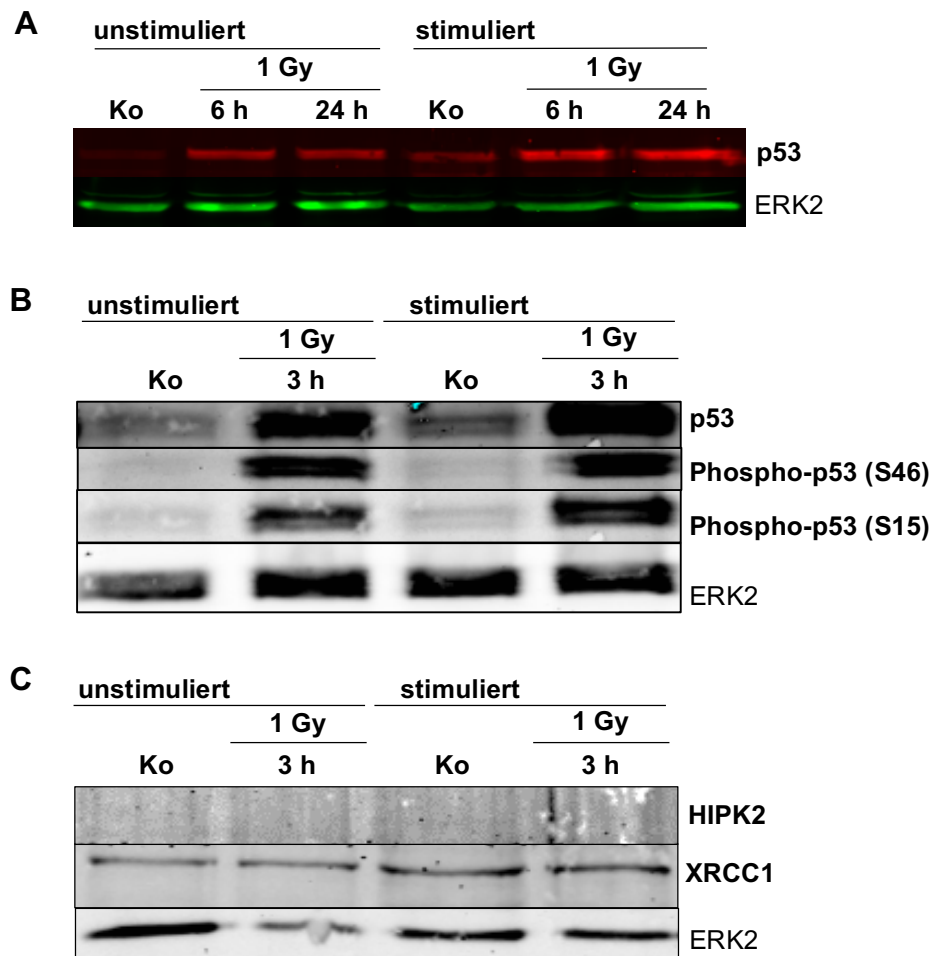


Abb. 3.31: Expression von p53 in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten nach unterschiedlichen Zeitpunkten und einer Exposition von 1 Gy. **A:** Expression von p53 (rot) und der Ladekontrolle ERK2 (grün) 6 bzw. 24h nach IR (Western Blot). **B:** Expression und Phosphorylierung von p53 an Ser46 und Ser15 3 h nach 1Gy Bestrahlung. **C:** Expression von HIPK2 und XRCC1. Ladekontrolle ist ERK2 (Western Blot).

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Strahlensensitivität mit unterschiedlichen Phosphorylierungen von p53 zwischen nicht-stimulierten und stimulierten Lymphozyten einhergeht, wurden weitere Proteinuntersuchungen mittels Western Blots durchgeführt (Abb. 3.31 B). Vergleicht man die Phosphorylierungsstellen von p53 an Ser46 und Ser15, so kann man auch hier keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten feststellen. So wurde in beiden Populationen nach 1 Gy Bestrahlung p53 an den Positionen Ser46 und Ser15 phosphoryliert. Dies bedeutet, dass sowohl apoptotische als auch transkriptionelle Funktionen von p53 aktiviert werden. Auslöser der p53 Phosphorylierungen sind sehr wahrscheinlich Faktoren der DDR. Die Abb. 3.31 C zeigt die Expression von XRCC1 in Lymphozyten, das in Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten und Granulozyten nicht exprimiert wird und in einer Sensitivierung gegenüber gentoxischen Stress in Monozyten resultiert (Bauer et al., 2011, Haak, Masterarbeit 2016). HIPK2, eine Kinase, die nach gentoxischem Stress u.a. p53 an Ser46 phosphoryliert (Hofmann et al., 2002), konnte in den

Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle hierfür dienten für die Western Blots CDT-behandelte HCT116-Zellen, die bei HIPK2 eine deutliche Bande zeigten und die Effizienz des Antikörpers bestätigen (in Abb. nicht gezeigt).

p53 ist u.a. ein Transkriptionsfaktor für den Fas-Rezeptor (FasR), der nach Aktivierung einen Caspase-abhängigen Zelltod auslösen kann. Der FasR wurde in unbestrahlten und 1 Gy bestrahlten Lymphozyten mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper am Durchflusszytometer analysiert (Abb. 3.32, A, repräsentative Histogramme; B Quantifizierung nach 24 h). Ausschließlich stimulierte Lymphozyten zeigten deutliche Signale einer FasR-Expression, signifikant stärker als in unstimulierten Lymphozyten. Dies war auch basal (Ko) zu erkennen, unabhängig von einer Exposition mit IR und kann vermutlich auf die basale p53-Expression in stimulierten Lymphozyten zurückgeführt werden kann. In stimulierten wie auch in unstimulierten Lymphozyten induzierte IR keine FasR-Expression, wobei vor allem in den sehr strahlensensitiven unstimulierten Lymphozyten ein Anstieg der FasR-Expression zu erwarten gewesen wäre.

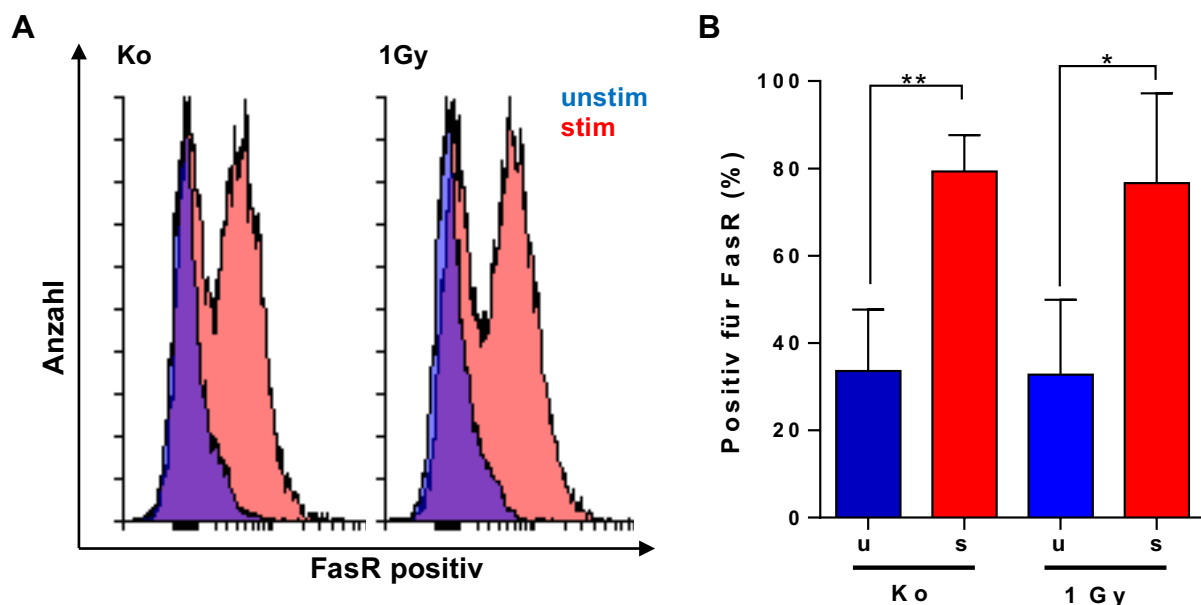


Abb. 3.32: Färbung des Fas-Rezeptors in unstimulierten (blau) und stimulierten (rot) PBLs und Analyse am Durchflusszytometer. A: Repräsentative Histogramme des FasR-Signals in unbehandelten (Ko) und 1 Gy bestrahlten PBLs nach 24 h. Eine Verschiebung des Signals nach rechts bedeutet eine Erhöhung der FasR-Expression an der Zelloberfläche. B: Quantifizierung des FasR-Signals (% der nach rechts verschobenen Population im Histogramm). t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Mittelwert, SD, $n = 3$.

Die FasR-Signale wurden auch in den PBLs markierten CTL (CD3+ CD8+) und Th (CD3+ CD4+) Population gemessen. Auch hier zeigten CTL und Th nur in stimulierten PBLs erhöhte FasR-Signale, die nicht durch eine Exposition mit IR beeinflusst wurden (im Anhang Abb. 6.10 A und B).

3.11 Caspase-Aktivität und Effekt der Caspase-Inhibition in Lymphozyten

Der Fas-Rezeptor löst den Caspase-abhängigen Zelltod über eine Aktivierung der Initiator-Caspase-8 aus (Gnesutta & Minden, 2003). Im Kontext der gemessenen FasR-Expression in den strahlenresistenten, stimulierten PBLs würde man jedoch in dieser Population eine erhöhte Caspase-Aktivität erwarten, im Zusammenhang einer erhöhten Strahlensensitivität jedoch höhere Caspase-Aktivitäten in unstimulierten Lymphozyten.

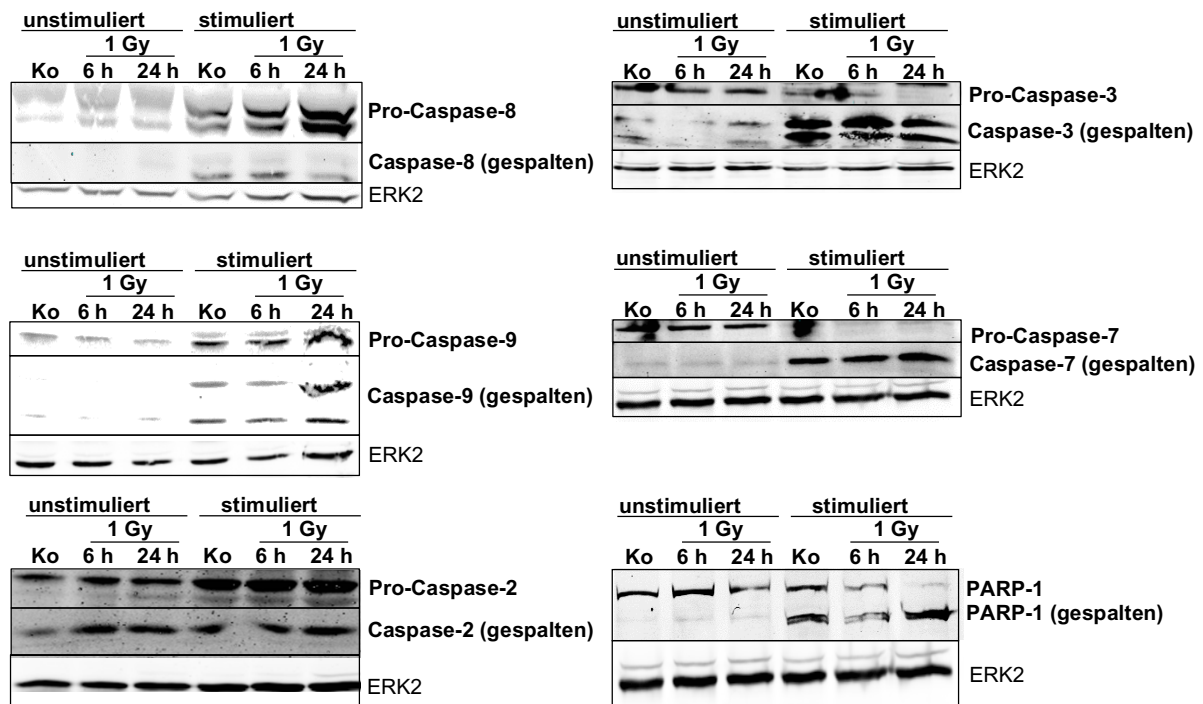


Abb. 3.33: Expression und Spaltung der Initiator-Caspasen-8, -9 und -2, der Effektor-Caspasen-3 und -7 sowie PARP-1 in unbestrahlten (Ko) und 1 Gy bestrahlten PBLs nach 6 bzw. 24 h. Gespaltene Caspasen sind nur in stimulierten PBLs detektierbar. Dies ist auch schon in der Kontrolle sichtbar ohne zusätzliche IR Exposition. Ausnahme bildet die Caspase-2, deren Spaltung auch in unstimulierten PBLs detektiert wird ($n = 2$). Eine Spaltung von PARP-1 als Signal der Caspase-Aktivität ist nur in stimulierten PBLs nachweisbar, auch in der unbehandelten Kontrolle. Allerdings ist eine Zunahme der PARP-1 Spaltung 24 h nach IR in stimulierten Zellen erkennbar. Ladekontrolle ERK2 (Western Blot).

Eine Spaltung der Initiator-Caspasen ist Voraussetzung, um die Signalkaskade der Effektor-Caspasen zu aktivieren. Abb. 3.33 zeigt die Expression bzw. Spaltung der Initiator-Caspasen-8, -9 und -2 sowie der Effektor-Caspasen-3 und -7 und PARP-1. Eine Spaltung der Caspasen-8, -9 sowie der Caspasen-3 und -7 ist nur in stimulierten PBLs unabhängig von einer Bestrahlung zu erkennen, was auf eine erhöhte Caspase-Aktivität in dieser Population schließen lässt. Die Spaltung von PARP-1 ist ein eindeutiger Hinweis der Caspase-3/-7-Aktivität. In Übereinstimmung mit den beobachteten Caspase-Spaltungen war auch nur in den stimulierten PBLs eine Spaltung von PARP-1 zu erkennen. Diese Spaltung wurde, anders als bei den Caspasen, durch IR nach 24 h verstärkt, war aber schon deutlich in der Kontrolle

aufgrund der T-Zellrezeptor-Aktivierung nachweisbar. Eine Ausnahme bildete die Caspase-2, deren Spaltung in unstimulierten PBLs nach IR induziert wurde, aber auch schon in der Kontrolle gespalten vorlag.

Ergänzend zur PARP-1 Spaltung wurde mittels eines spezifischen Lumineszenz-Assays die Caspase-3/-7 Aktivität gemessen. Auch hier zeigten stimulierte PBLs unabhängig von einer IR-Exposition deutlich höhere Signale als unstimulierte PBLs. In unstimulierten PBLs lässt sich ein leichter, strahleninduzierter Anstieg der Caspase-3/-7-Aktivität nachweisen (ns, t-Test), die jedoch weit unterhalb der stimulierten Population lag (Abb. 3.34 nach 24 h, im Anhang Abb. 6.11 nach 6 h).

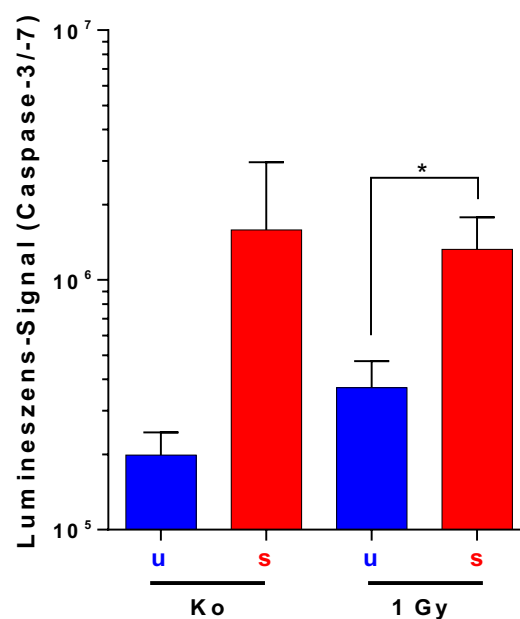


Abb. 3.34: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität mittels Lumineszenz-Assay in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs), unbehandelt (Ko) oder 24 h nach 1 Gy. Logarithmische Skala. t-Test, *p < 0,05, Mittelwert, SD, n = 3.

Um eine mögliche Beteiligung von Caspasen im strahleninduzierten Zelltod von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten weiter auszuschließen, wurden die Zellen vor ihrer Exposition mit IR mit einem Pan-Caspase-Inhibitor behandelt, der die Aktivität der gesamten Caspasen hemmt. Abb. 3.35 A zeigt den IR-vermittelten Zelltod von 0,5 und 1 Gy bestrahlten PBLs, die 1 h vor Exposition mit IR nicht (links) bzw. mit (rechts) einem Pan-Caspase-Inhibitor vorbehandelt wurden. Ohne Inhibitor zeigen unstimulierte PBLs nach 0,5 und 1 Gy die schon zuvor ermittelte, hohe Strahlensensitivität im Vergleich zu stimulierten Zellen. Wurden die unterschiedlichen Populationen vor Exposition mit IR mit einem Pan-Caspase-Inhibitor vorbehandelt, so waren erstens die Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten PBLs weiterhin signifikant, zweitens wurde weder in unstimulierten noch stimulierten PBLs ein

Schutz gegenüber IR vermittelt. Eine Aktivierung der Caspasen ist für den strahlenvermittelten Zelltod von Lymphozyten nicht erforderlich. Die Effektivität des Pan-Caspase-Inhibitors wurde im zuvor genannten Caspase-Aktivitäts-Lumineszenz Assays an stimulierten PBLs getestet, wobei eine effektive Wirkung des Inhibitors im verwendeten Konzentrationsbereich von 20 μM bestätigt werden konnte (Abb. 3.35 B).

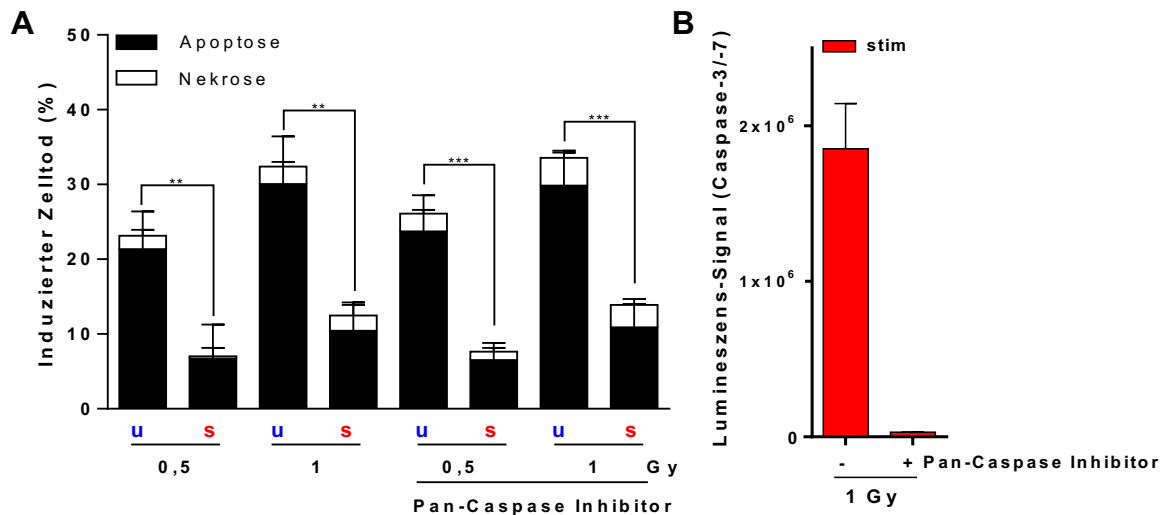


Abb. 3.35: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne Pan-Caspase-Inhibition (A links) bzw. mit Pan-Caspase-Inhibition (A rechts) 24 h nach Behandlung.
A: AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Mittelwert, SD, $n = 4$ (A), $n = 2$ (B).
B: Überprüfung der Effizienz des Pan Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK (20 μM) mittels Caspase-3/7-Aktivitäts-Lumineszenz Assays.

Um zu untersuchen, ob die Caspase-2 aufgrund der Expression bzw. Spaltung im Western Blot (Abb. 3.33) am IR-vermittelten Zelltod beteiligt ist, wurden die Zellen mit einem spezifischen Caspase-2-Inhibitor vorbehandelt. Auch hier konnten unstimulierte PBLs nicht vor strahleninduziertem Zelltod geschützt werden (Abb. 3.36). Aufgrund der hohen interexperimentellen Varianz war aber der Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten PBLs nicht mehr signifikant. In einem weiteren Experiment ($n = 1$) wurde eine höhere Dosis des Caspase-2-Inhibitors von 40 μM verwendet. Ein deutlicher Schutz der Zellen vor γ -Strahlung war auch hier nicht ersichtlich (Abb. 3.36).

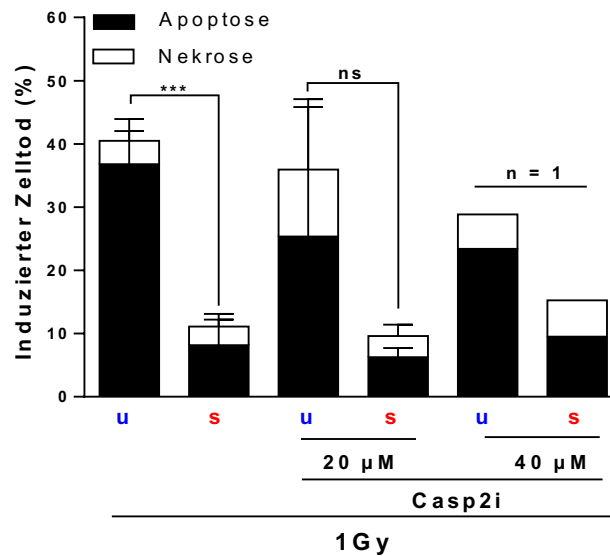
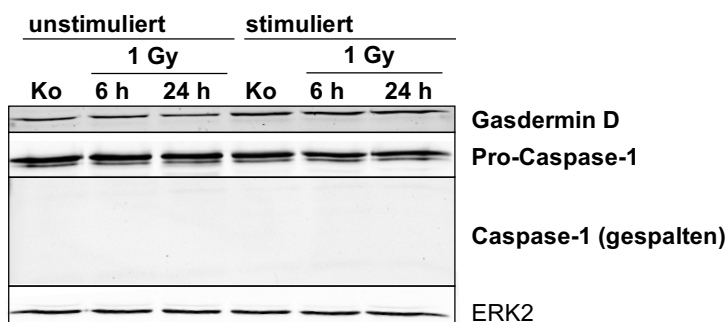


Abb. 3.36: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne (links) und mit Caspase-2-Inhibition (rechts). AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. Caspase-2-Inhibitor Z-VDVAD-FMK FMK003. t-Test, ***p < 0,001. Mittelwert, SD, n = 3 - 4.

Um die Rolle einer möglichen Pyroptose als Ursache für den strahleninduzierten Zelltod in unstimulierten Lymphozyten auszuschließen, wurde ein weiterer Fokus auf die Caspase-1 und deren Substrat Gasdermin D gelegt. Es konnte jedoch weder in unstimulierten noch in stimulierten Lymphozyten eine Spaltung der Caspase-1 und deren Substrat Gasdermin D festgestellt werden (Abb. 3.37 A). Weiterhin konnte eine spezifische Caspase-1-Inhibition keinen schützenden Effekt gegen den IR-vermittelten Zelltod in unstimulierten wie auch stimulierten Lymphozyten hervorrufen (Abb. 3.37 B). Pyroptose kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

A



B

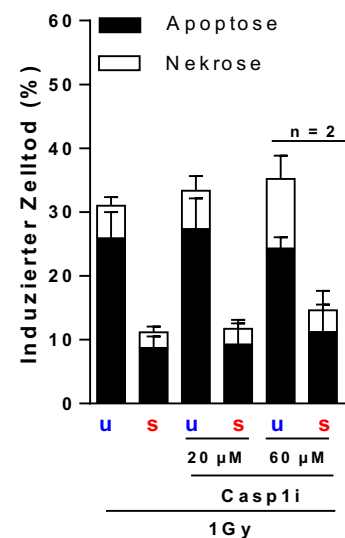


Abb. 3.37: A: Expression und Spaltung von Gasdermin D und Caspase-1 in unbestrahlten (Ko) und 1 Gy bestrahlten Lymphozyten (PBLs) nach 6 bzw. 24 h. B: IR-induzierter Zelltod nach 24 h in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten ohne (links) und mit Caspase-1-Inhibition (rechts). AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. Caspase-1-Inhibitor Z-WEHD-FMK. Mittelwert, SD, n = 2 - 4.

Zusammengefasst kann also auf einen Caspase-unabhängigen, strahleninduzierten Zelltod in Lymphozyten geschlossen werden. Allerdings bedarf die Bedeutung der endgültigen Rolle der Caspase-2 (Bsp. Caspase-2-Aktivitätsassay) sowie der Caspase-11 noch weiterer Studien.

3.12 Einfluss einer Inhibition von PARP auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

Strahlung induziert in Zellen SSB, an deren Reparatur PARP-1 beteiligt ist. Eine PARP-1 Spaltung konnte nur in stimulierten PBLs nachgewiesen werden, unabhängig von der Exposition mit IR. Das lässt vermuten, dass durch die PARP-1 Spaltung weniger PARP-Aktivität in stimulierten Lymphozyten vorliegt bzw. weniger PARP nach äußeren Einflüssen aktiviert werden kann. Trotz der hohen Strahlensensitivität von unstimulierten Lymphozyten konnte in diesem Zellsystem keine Caspase-Aktivität bzw. Spaltung von Caspasen gemessen werden. Im Folgenden wurde überprüft, inwieweit der PARP-abhängige Zelltod, auch Parthanatos genannt, involviert ist.

Die Abb. 3.38 A zeigt den strahleninduzierten Zelltod nach 24 h in Lymphozytenpopulationen ohne Inhibition (links) und mit Inhibition von PARP (rechts) durch Olaparib nach 0,5 bzw. 1 Gy IR. Eine Hemmung von PARP hatte keinen Einfluss auf den strahleninduzierten Zelltod, weder in unstimulierten noch stimulierten PBLs. Eine Erhöhung der Olaparib-Konzentration auf 5 µM hatte weder eine schützende, noch sensitivierende Wirkung auf unstimulierte Lymphozyten gegenüber IR (Abb. 3.38 B).

Die Effektivität von Olaparib wurde mit einer PAR-Färbung in H₂O₂ behandelten Lymphozyten am LSM überprüft (Abb. 3.38 C). H₂O₂ induziert SSB, aktiviert somit PARP-1, was wiederum das Biopolymer PAR synthetisiert. H₂O₂ induzierte die PAR-Bildung in unstimulierten sowie stimulierten PBLs (Abb. 3.38 C). Die Bildung von PAR war in stimulierten Lymphozyten deutlich höher, was vermutlich auf eine stärkere Bildung von SSB aufgrund einer Auflockerung des Chromatins als Folge der Aktivierung und somit ein erleichtertes Eindringen von H₂O₂ in das Chromatin ermöglicht (Crompton et al., 2016). Eine Vorbehandlung mit 0,5 µM Olaparib bewirkt eine deutliche Abnahme des PAR-Signals und bestätigt somit die effiziente Wirkung des Inhibitors (PAR-Signale in Lymphozyten nach IR im Anhang in Abb. 6.12).

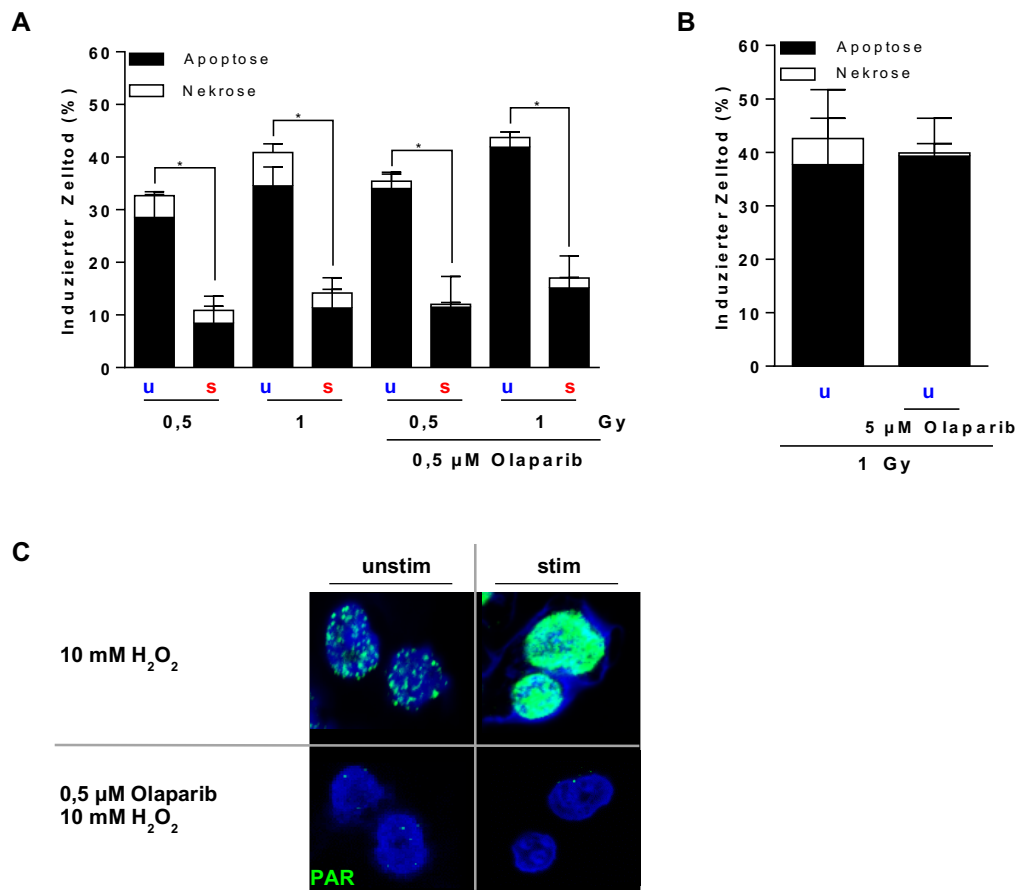


Abb. 3.38: Einfluss des PARP-Inhibitors Olaparib auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.
A: Zelltodinduktion (AnnexinV/PI) von PBLs 24 h nach 0,5 bzw. 1 Gy ohne (links) und mit (rechts) Hemmung von PARP. Mittelwert, SEM, $n = 3$. **B:** Einfluss einer 10fach höheren Dosis von Olaparib auf den strahleninduzierten Zelltod in unstimulierten PBLs. t-Test, $*p < 0,05$, Mittelwert, SD, $n = 3$. **C:** PAR-Färbung am konfokalen Mikroskop zur Überprüfung der Effektivität von Olaparib in H_2O_2 behandelten Lymphozyten.

Um Parthanatos als Signalweg weiter auszuschließen, wurde immunhistochemisch AIF in den Zellen detektiert. Dabei ist eine Translokation von AIF in den Zellkern im Verlauf des PARP-1 vermittelten Zelltodes typisch für Parthanatos (Wang et al., 2009). Die Abb. 3.39 zeigt die Färbung und Lokalisation von AIF in unbehandelten (Ko) unstimulierten und stimulierten Lymphozyten, sowie in 1 Gy exponierten Zellen nach 4 bzw. 24 h. Eine Translokalisierung von AIF in den Zellkern war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar.

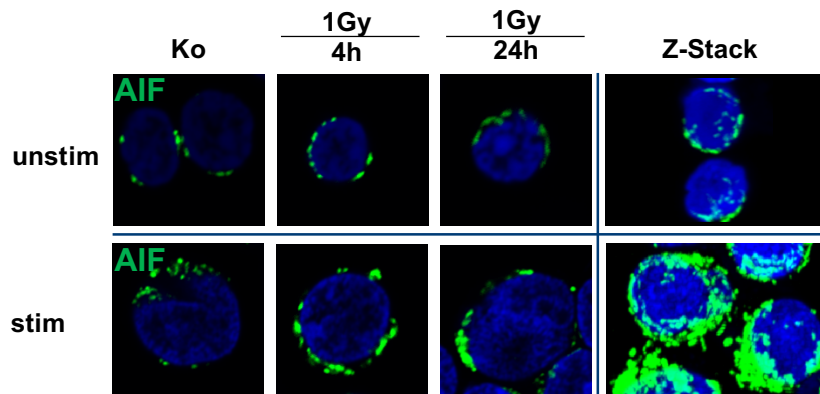


Abb. 3.39: Immunhistochemische Färbung des *Apoptosis-Inducing Factor* (AIF) in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten, unbehandelt (Ko) und 4 bzw. 24 h nach 1Gy. Repräsentative 3D-Bildern aufgenommen am LSM (Z-Stacks) geben die Lokalisierung von AIF außerhalb des Zellkerns wieder. AIF ist nicht im Zellkern nachweisbar. AIF, grün; Kern, blau.

AIF-Signale waren nur außerhalb des Zellkerns zu erkennen. Die Z-Stacks verdeutlichen nochmals, dass die Signale im Zytosol liegen und sehr wahrscheinlich die Mitochondrien als Speicherort von AIF andeuten. Auffallend in den Z-Stacks ist das sehr ausgeprägte und weit im Raum bzw. Zytosol lokalisierte AIF-Signal in den stimulierten Lymphozyten. Dies resultiert vermutlich aus einer Erhöhung der Mitochondrienanzahl infolge der gesteigerten metabolischen Aktivität. Dazu müssten in zukünftigen Versuchen zusätzlich eine *Mitotracker*-Färbung durchgeführt werden. Die gezeigten Ergebnisse sprechen gegen Parthanatos als möglichen IR-vermittelten Zelltodsignalweg in Lymphozyten.

Erste Hinweise in Richtung einer Autophagie und Seneszenz sind im Anhang unter Abb. 6.13 und 6.14 dargestellt. Autophagie als Recycling- und Schutzmechanismus kann u.a. vor Gentox-induziertem Zelltod, so auch vor IR, schützen (Qiang, Wu, Ming, Viollet, & He, 2013). Vorläufige Versuche zeigten höhere Autophagie-Signale (CytolD®-Färbungen) in stimulierten als unstimulierten Zellen (im Anhang Abb. 6.13). IR-vermittelte zugleich einen leichten, aber signifikanten Anstieg von Zellen in Autophagie in der unstimulierten Fraktion. Weitere Untersuchungen wie z.B. die Induktion von LC-3B stehen aus und die Daten müssten mit geeigneten Positivkontrollen verifiziert werden.

Das Gleiche gilt für einen möglichen Einfluss der Seneszenz. Seneszenz könnte so z.B. in proliferierenden, stimulierten Lymphozyten ausgelöst werden und die Zellen vor IR-vermitteltem Zelltod schützen. Eine Induktion der Seneszenz (FDG-Färbung am Durchflusszytometer zur Messung der SA- β -Galaktosidase) konnte nach IR, insbesondere in stimulierten Zellen, nicht festgestellt werden (im Anhang Abb. 6.14). Hier fehlen jedoch zusätzliche Positivkontrollen. Des Weiteren zeigten stimulierte Zellen eine hohe FDG-

Autofluoreszenz, was darauf hinweist, dass definierte *Gating*-Strategien am Durchflusszytometer nochmals überdacht werden sollten.

3.13 Einfluss der Inhibition von ATM, ATR, p53 und RIP1 auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

Die Prozesse des strahleninduzierten Zelltodes in Lymphozyten werfen Fragen bzgl. des zugrunde liegenden Signalweges auf. Einerseits ist dieser Caspase-unabhängig, da eine deutliche Caspaseaktivität nach T-Zell-Stimulation nicht zum Zelltod führte und eine Inhibition von Caspasen keinen Schutz vor IR in unstimulierten Zellen hervorrief. Andererseits zeigten sie apoptotische Signale durch AnnexinV-Färbung, keine Nekrose oder Anzeichen von Parthanatos, nach ersten Hinweisen auch keine Autophagie oder Seneszenz. Da aber vermutet wird, dass die durch Strahlung induzierten DNA-Schäden trotz ihrer effizienten Reparatur den Zelltod triggern, wurde die DNA-Schadensantwort näher untersucht. Vor Exposition mit IR wurden die Lymphozyten mit Inhibitoren gegen ATM, ATR, p53 und der RIP1-Kinase inkubiert.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.40 dargestellt. Interessanterweise schützt die Inhibition von ATM, das Sensorprotein für DSB, unstimulierte Lymphozyten fast vollständig von IR-induziertem Zelltod (von 37 auf 2 %). Dies stellte sich als sehr überraschend heraus, da die Inhibition von ATM insbesondere in Tumorzellen gegenüber IR allgemein als sensibilisierend beschrieben wird (Hammond & Muschel, 2014). Eine Inhibition von ATR, welches u.a. durch SSB nach Replikationsstress phosphoryliert wird (Marechal & Zou, 2015), zeigte hingegen keinen schützenden Effekt, sensibilisierte sogar leicht unstimulierte wie auch stimulierte Lymphozyten. Eine Inhibition von p53 zeigte ebenso keinen Effekt, trotz der zuvor gezeigten Induktion und Phosphorylierung von p53 nach IR (Abb. 3.40, im Anhang Abb. 6.15 A zeigt Daten nach Vorbehandlung mit einer höheren Inhibitor-Konzentration von 100 μ M). Dies liegt vermutlich an der Wirkung des p53-Inhibitors (zyklisches-Pifithrin- α), der p53 auf transkriptioneller Ebene hemmt (Sohn et al., 2009). p53 scheint somit nicht im IR-vermittelten Zelltod von Lymphozyten involviert zu sein. Zur Vollständigkeit wurde auch mit Necrostatin-1, ein Inhibitor der RIP1-Kinase und somit der Nekroptose, vorbehandelt. Necrostatin-1 hatte keinen Einfluss auf den strahleninduzierten Zelltod in Lymphozyten. Dies schließt eine Rolle der Nekroptose aus, was mit der zuvor ermittelten geringen PI-Positivität (Nekrose) der Zellen einhergeht.

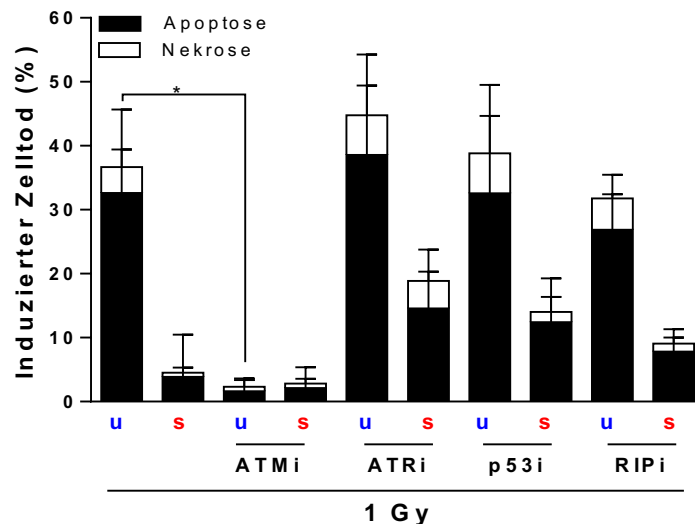


Abb. 3.40: Effekt der Inhibition von ATM, ATR, p53 und RIP1 auf den strahleninduzierten Zelltod in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 24 h nach 1 Gy. ATMi (KU60019, 6 μ M), ATRi (VE-822, 10 μ M), p53i (Zyklisches Pifithrin- α , 30 μ M) und RIP1i (Necrostatin-1, 100 μ M) 1 h Vorbehandlung mit dem Inhibitor, danach Exposition mit 1 Gy. links, Strahleneffekt ohne Inhibitor; rechts, mit Inhibitor. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. t-Test, *p < 0,05, Mittelwert, SD, n = 3.

Der Effekt der ATM-Inhibition ist sehr deutlich und wurde, wie in Abb. 3.41 A gezeigt, nochmals mit einer geringeren Inhibitorkonzentration verifiziert. Da der Inhibitor in DMSO gelöst war und DMSO ein ROS Fänger ist und somit die Wirkung von IR abschwächen könnte, wurde eine DMSO Kontrolle mitgeführt. DMSO zeigte keine Wirkung auf den IR-vermittelten Zelltod. Der protektive Effekt der ATM-Hemmung wurde nochmals mit einem anderen ATM-Inhibitor (KU55933) überprüft und bestätigt (im Anhang Abb. 6.15 B).

Die Effizienz des Inhibitors wurde mittels pATM-Färbung am konfokalen Mikroskop überprüft (Abb. 3.41 B). So zeigten T-Zellen 30 min nach 2 Gy deutliche Signale von phosphoryliertem ATM, was auf eine Aktivierung und Autophosphorylierung von ATM hinweist. Werden die Zellen vor Bestrahlung mit dem ATM-Inhibitor behandelt, so ist kein pATM-Signal detektierbar. Dies lässt auf eine effektive Wirkung des Inhibitors schließen.

Die Untersuchungsergebnisse führen zur Schlussfolgerung: ATM, ein Protein, das generell schützende Eigenschaften gegenüber Strahlung und anderen Genotoxinen in Zellen aufweist, ist in Lymphozyten bzgl. γ -Strahlung ein zelltodauslösender Faktor!

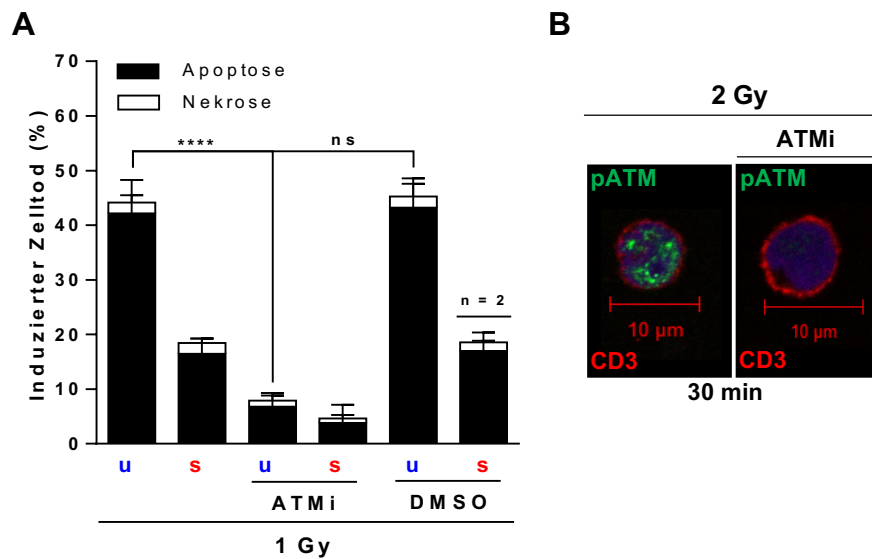


Abb. 3.41: Effekt der Inhibition von ATM auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten.
A: ATMi (KU60019, 3 μM) 1 h Vorbehandlung mit dem Inhibitor, danach Exposition mit 1 Gy. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. One-Way ANOVA (Dunnett), ****p < 0,0001. Mittelwert, SD, n = 3. **B:** Immunhistochemische Färbung (LSM) von pATM (grün) in T-Zellen (CD3, rot) 30 min nach 2 Gy ohne und mit Vorbehandlung des ATM-Inhibitors (KU60019, 3 μM).

3.14 Einfluss der Inhibition von CHK1 und CHK2 auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

Im Folgenden wurde der Effekt einer Hemmung der ATM und ATR *Downstream*-Kinasen CHK1 und CHK2 auf den IR-vermittelten Zelltod betrachtet. Die Inhibition resultierte auch hier in einem signifikanten Schutz unstimulierter Lymphozyten gegenüber IR (Abb. 3.42). Die Inhibition von CHK2 (von 42 auf 19 %) schützte unstimulierte Lymphozyten effektiver vor γ-Strahlung als die Hemmung von CHK1 (von 42 auf 30 %). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass ATM stärker CHK2 aktiviert und CHK1 vielmehr durch ATR phosphoryliert wird (Bartek & Lukas, 2003). Eine kombinierte Inhibition von CHK1 und CHK2 erbrachte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur CHK2-Hemmung. Der Effekt der CHK2-Hemmung ist jedoch weniger deutlich ausgeprägt als die Wirkung des ATM-Inhibitors. Die CHK-Inhibitoren zeigten keinen Effekt auf die Zelltodinduktion in stimulierten Lymphozyten.

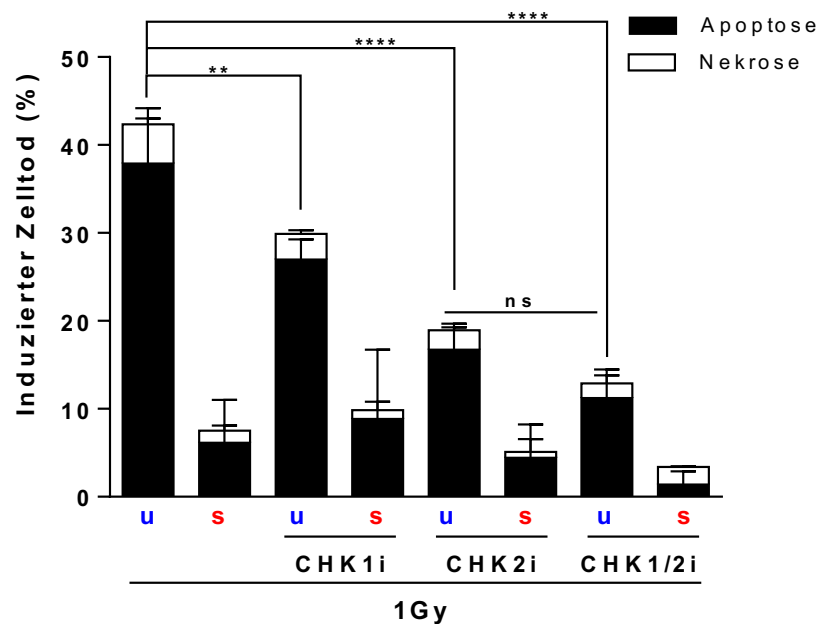


Abb. 3.42: Effekt der Inhibition von CHK1 und CHK2 auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten. 1 h Vorbehandlung mit CHK1i (UCN-1, 150 nM) und CHK2i (CHK2-Inhibitor II, 10 µM), danach Exposition mit 1 Gy und Zelltodmessung 24 h später. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. Two-Way ANOVA (Tukey), **p < 0,01, ****p < 0,0001. Mittelwert, SD, n = 3 - 5.

3.15 Einfluss der Inhibition des MRN-Komplexes (MRE11) und DNA-PK auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

Welchen Effekt hat nun die Hemmung des ATM *Upstream*-Proteins MRE11 und von DNA-PK auf den strahleninduzierten Zelltod in Lymphozyten? Der MRN-Komplex aktiviert u.a. direkt ATM nach einem auftretenden DNA-Schaden. Die Inhibition des MRN-Komplexes wurde über das Agens Mirin vermittelt, das selektiv MRE11 hemmt. Mirin schützte signifikant unstimulierte Lymphozyten vor strahleninduziertem Zelltod (Abb. 3.43 A). Dabei konnte der induzierte Zelltod von unstimulierten Lymphozyten von 41 auf 17 % reduziert werden. Ähnlich zur ATM-Inhibition zeigte auch die MRN-Komplex-Hemmung keinen Einfluss auf den strahleninduzierten Zelltod in stimulierten Lymphozyten.

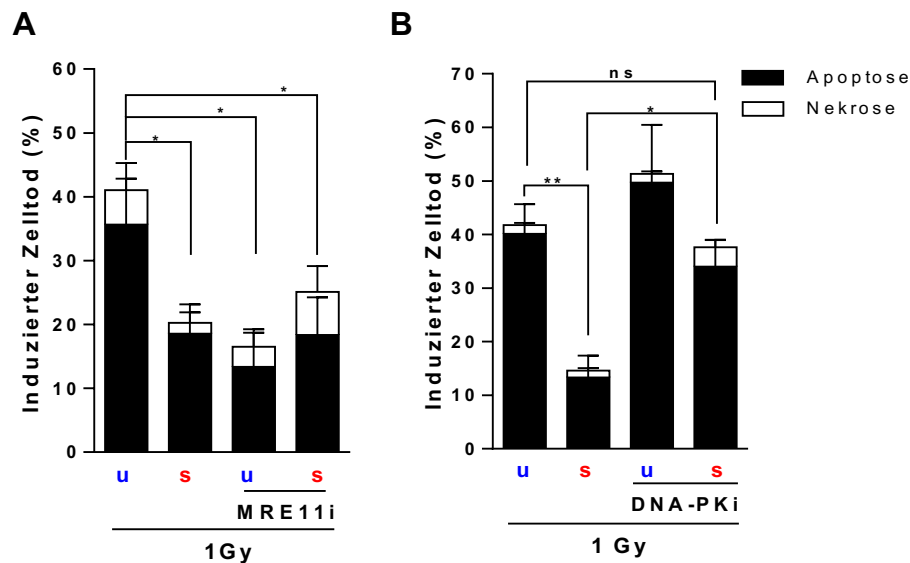


Abb. 3.43: Effekt der Inhibition von MRE11 und DNA-PK auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten. 1 h vor IR behandelt mit **A:** MRE11i (Mirin, 25 µM) oder **B:** DNA-PKi (KU 0060648, 5 µM), danach Exposition mit 1 Gy und Zelltodmessung nach 24 h. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. Two-Way ANOVA (Tukey), *p < 0,05, **p < 0,01. Mittelwerte, SD, n = 3.

DNA-PK, ein Komplex von DNA-PKcs, KU70 und Ku80, ist neben ATM und ATR ein weiterer Sensor von DNA-Schäden und ein Initiator von deren Reparatur. Eine Inhibition von DNA-PK vor der Exposition mit IR schützte Lymphozyten nicht vor einer Einleitung des Zelltodes. Weder in unstimulierten noch in stimulierten Lymphozyten konnte der IR-induzierte Zelltod reduziert werden (Abb. 3.43 B). Darüberhinaus war die Hemmung von DNA-PK sensibilisierend gegenüber IR, insbesondere in stimulierten Lymphozyten. Diese zeigten durch Vorbehandlung mit dem DNA-PK-Inhibitor einen signifikanten Anstieg des Zelltods von 15 auf 37 %. Der induzierte Zelltod in unstimulierten Lymphozyten wurde durch die Hemmung von DNA-PK von 40 auf 50 % erhöht.

3.16 Einfluss der Vorbehandlung mit Dasatinib auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

ATM kann u.a. über die Kinase c-Abl Zelltod auslösen. Dies sollte mithilfe einer Vorbehandlung mit Dasatinib, das zur Behandlung von Leukämien (CML, ALL) verwendet wird und die Tyrosinkinase c-Abl hemmt, überprüft werden. Damit könnte ausgeschlossen werden, dass ATM über eine Aktivierung von c-Abl den Zelltod auslöst (Christmann et al., 2007). Die Lymphozyten wurden zuvor mit Dasatinib behandelt, 1 h später mit 1 Gy behandelt und nach 24 h der Zelltod gemessen. Es konnte kein Einfluss von Dasatinib auf den strahlenvermittelten Zelltod in Lymphozyten festgestellt werden (Abb. 3.44).

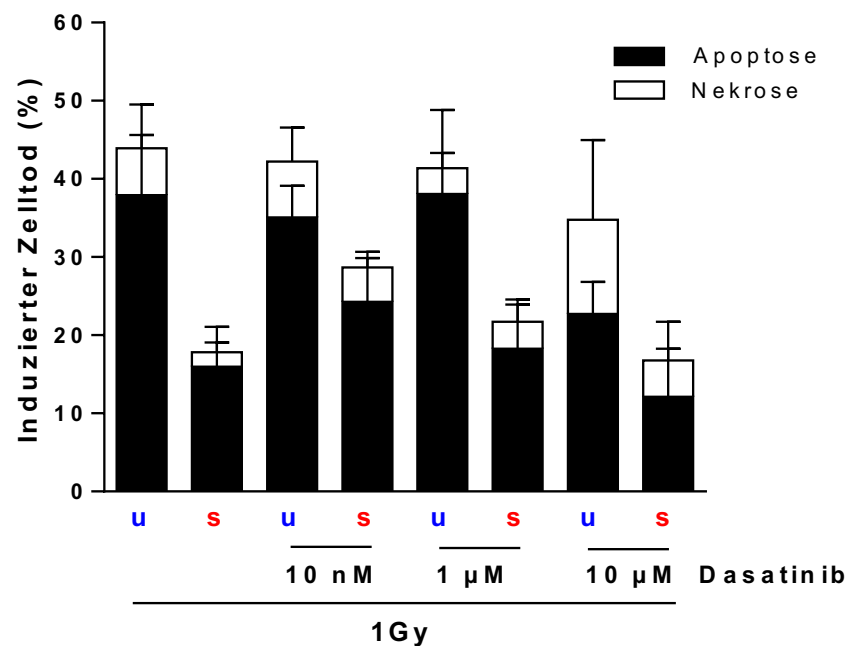


Abb. 3.44: Effekt der Vorbehandlung unterschiedlicher Dosen Dasatinib auf den strahleninduzierten Zelltod von Lymphozyten. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. Mittelwert, SD, n = 3 - 5.

Bei der Behandlung mit Dasatinib konnte nicht überprüft werden, ob spezifisch c-Abl gehemmt wird, da Dasatinib auch andere Kinasen hemmt (Src, c-Kit). Dies müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass c-Abl nicht im IR-induzierten Zelltod von Lymphozyten involviert ist.

Die jeweilige Toxizität der in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren wurde zusammenfassend im Anhang in Abb. 6.16 dargestellt.

3.17 Immunhistochemische Färbung von phospho-ATM in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten

Im nächsten Versuch wurde verglichen, ob es Unterschiede in der strahleninduzierten Phosphorylierung von ATM und somit in der Aktivität von ATM in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten gibt. Dazu wurde in 2 Gy exponierten und nicht-exponierten CD3+ T-Zellen (rot) immunhistochemisch pATM (grün) angefärbt und am LSM analysiert (Abb. 3.45 A, B). In stimulierten PBLs wurden hauptsächlich Zellen ausgezählt, die deutlich in ihrer Morphologie vergrößert waren. Interessanterweise zeigten bestrahlte, stimulierte T-Lymphozyten signifikant weniger pATM Signale als unstimulierte Zellen, was auf eine geringere strahleninduzierte Aktivierung von ATM in den stimulierten Lymphozyten hindeutet. Die geringe ATM-Aktivität nach IR-Exposition in stimulierten Lymphozyten bekräftigt die zuvor

getroffene Aussage, dass ATM ein zelltodinduzierender Faktor in unstimulierten Lymphozyten ist und stimulierte Zellen resistenter gegenüber IR sind.

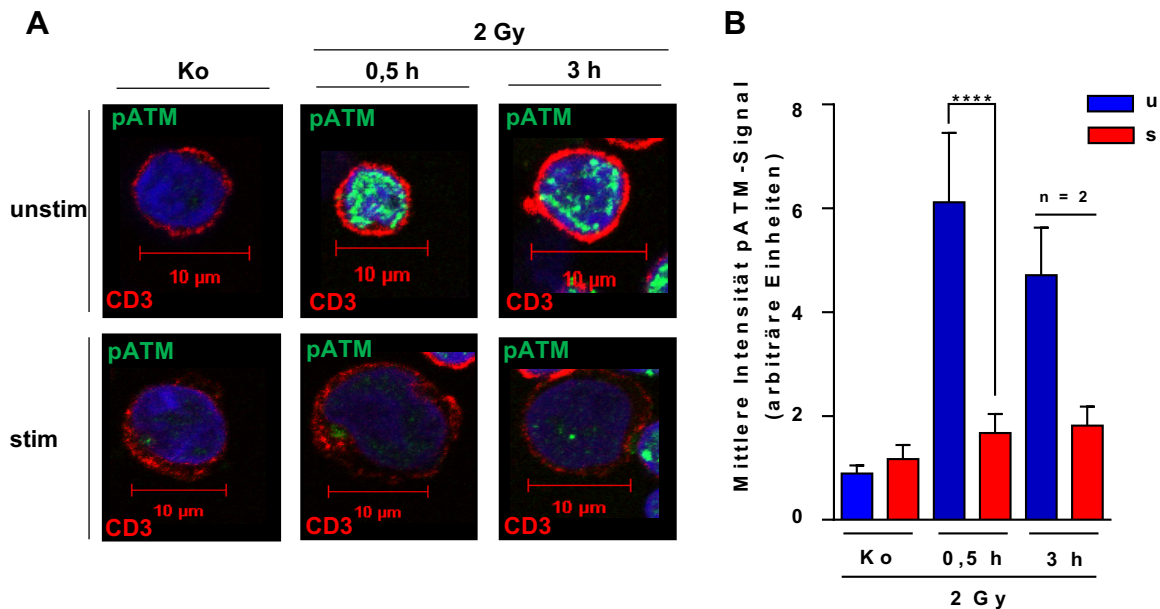


Abb. 3.45: Immunhistochemische Färbung von phospho-ATM (pATM) in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten unbehandelt (Ko) und 0,5 bzw. 3 h nach Exposition mit 2 Gy. A: Repräsentative Bilder, aufgenommen am LSM. pATM, grün; CD3, rot; Kern, blau. **B:** Quantifizierung der mittleren Intensität des pATM-Signals von 53 - 66 Zellen aus insgesamt 3 *Buffy Coats*. t-Test, ****p < 0,0001. Mittelwert, SD, n = 2 - 3.

Wie zuvor gezeigt (Abb. 3.31) wird in Lymphozyten nach IR p53 induziert und an den Positionen Ser46 und Ser15 phosphoryliert. In Abb. 3.46 wurde die Expression von p53 in behandelten und unbehandelten Lymphozyten untersucht, die zuvor mit einem ATM-Inhibitor behandelt wurden. Als Positivkontrolle dienten (wie auch in Abb. 3.31) mit dem bakteriellen Toxin CDT behandelte HCT116 Zellen. In ATM-gehemmten unstimulierten sowie stimulierten Lymphozyten konnte nach Bestrahlung keine Induktion von p53 und auch kein phosphoryliertes p53 an Ser46 und Ser15 detektiert werden.

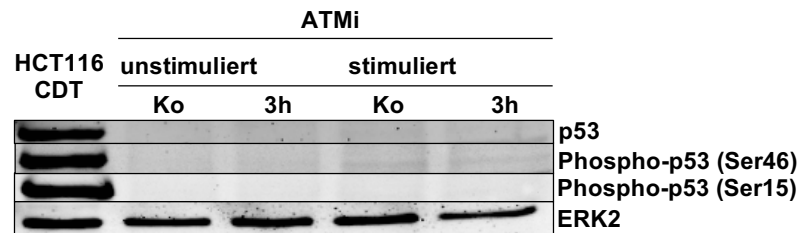


Abb. 3.46: Induktion und Phosphorylierung von p53 nach Hemmung von ATM in unbehandelten (Ko) und nach 1 Gy exponierten (3h) unstimulierten und stimulierten Lymphozyten. ATMi KU60019, 3 μ M. CDT-behandelte HCT116 als Positivkontrolle. (Western Blot), n = 2.

p53 wird nach IR in Lymphozyten nicht induziert, wenn ATM inhibiert ist. Die Western Blots bestätigen somit wiederum die Effektivität des ATM-Inhibitors KU60019, da die Phosphorylierung von p53 in direktem Zusammenhang zu einer ATM-Aktivierung steht (Canman et al., 1998). Wie zuvor gezeigt, konnten keine Unterschiede in der Induktion und Phosphorylierung von p53 zwischen den IR-resistenten stimulierten und IR-sensitiven unstimulierten Lymphozyten festgestellt werden (Abb. 3.31) und eine Hemmung von p53 mit zyklischem Pifithrin- α hatte keinen Einfluss auf die Strahlensensitivität der Lymphozyten (Abb. 3.40). Jedoch vermittelt eine ATM-Hemmung eine Strahlenresistenz in Lymphozyten und unterdrückt gleichzeitig eine p53-Expression und Phosphorylierung. Ein weiterer Zusammenhang von p53 und einer Zelltodinduktion nach IR müsste somit evtl. mit weiteren p53 Inhibitoren oder p53 siRNA überprüft werden.

3.18 Analyse der Genexpression mittels *Real-Time* RT-PCR: Vergleich von CD3/CD28-aktivierten vs. nicht-aktivierten Lymphozyten

Genexpressionsanalysen werden z.T. über Real-Time RT-PCR gemessen, um das Expressionsmustern anhand isolierter mRNA zu detektieren. Hier wurde die Genexpression von unstimulierten und CD3 T-Rezeptor und CD28 Ko-Rezeptor stimulierten Lymphozyten verglichen. Der mRNA-Pool gibt Hinweise, welche Proteine in Folge der Genaktivität translatiert werden können (aber nicht müssen) und dem Zellsystem prinzipiell zur Verfügung stehen. In diesem Fall kann eine Aussage getroffen werden, welchen genetischen Aktivitätsstatus die Lymphozyten zum Zeitpunkt der Exposition mit IR oder gentoxischer Agenzien aufweisen. Dies könnte Antworten auf die unterschiedliche Strahlensensitivität liefern. Deshalb wurden Gene, die in Relation zur DNA-Reparatur, DNA-Schadensantwort, Apoptose und Überleben stehen, untersucht.

Die Gene *ERCC6*, *UBE4A* und *ENOX2* dienten als Referenz, da sie sich in zuvor durchgeführten Tests in ihrer Expression als geeignet erwiesen. Die Expression der Gene in unstimulierten Lymphozyten wurde auf 1 relativiert. So konnte die X-fache Expression der

stimulierten Lymphozyten im Vergleich zur unstimulierten Population dargestellt werden. Die Abb. 3.47 A zeigt eine Tabelle des Genexpressions-Screenings von Zellpopulationen isoliert aus einem *Buffy Coat* ($n = 1$). Es wurde eine Herunterregulation ab 0,5-fach bzw. eine Hochregulation ab 3-fach zur Kontrolle (unstimulierte Population) als biologisch relevant definiert. Aufgrund der Komplexität und dem Aufwand der Experimente wurden in Abb. 3.48 B nur einige spezifische Gene nochmals bis $n = 3$ (Zellen aus bis zu drei *Buffy Coats*) quantifiziert.

Es stellte sich heraus, dass nur wenige der untersuchten Gene während der Lymphozytenaktivierung herunterreguliert wurden. Das erscheint auch nicht ungewöhnlich, da bei der Stimulation Lymphozyten metabolisch aktiviert werden und somit eine Fülle von Funktionen innerhalb des Prozesses einer Immunantwort ausüben. Sehr interessant ist das Ergebnis, dass vor allem das *ATM*-Gen als eines der wenigen bei Aktivierung des T-Zellrezeptors transkriptionell herunterreguliert wurde (Abb. 3.47 A). Denn wie zuvor gezeigt ist *ATM* in der Zelltodinduktion von Lymphozyten nach IR verantwortlich und eine Aktivierung der T-Zellrezeptoren geht mit einer Strahlenprotektion einher. Die transkriptionelle *ATM*-Herunterregulation konnte auch in weiteren Proben nachgewiesen werden (Abb. 3.47 B). Weiterhin wurde das proapoptotische Gen *PUMA* herunterreguliert, was nur in 2 von 3 *Buffy Coats* verifiziert werden konnte. Die Gene für *NOX1*, das für die ROS-produzierende NADPH-Oxidase codiert, *RAD52*, welches in der DNA-Doppelstrangbruchreparatur aktiv ist, sowie das Gen für die NER-Exonuklease *XPG*, sind einige der Gene, die nach Stimulation von CD3 und CD28 in PBLs herunterreguliert wurden.

Auf folgende Gene des Screens konnte u.a. kein deutlicher Einfluss der Stimulation festgestellt werden: den Regulator der Autophagie *Beclin-1*, das Gen für den Autophagie-Faktor *ATG7*, das für p53 codierende *TRP53*, *MDM2* als Inhibitor von p53, *XIAP* und *cIAP1* als Inhibitoren der Apoptose, Gene der NER wie *XPF* und *DDB2*, Gene der MMR wie *MSH6* und *MLH3*, Gene der BER wie *XRCC1*, *OGG1*, *LIG3* und *LIG1*, *CHK2*, *AKT1*, pro-apoptotisches *BAX*, *APAF1* und *CASP2*, sowie die Gene für die DNA-Schadenssensoren des MRN Komplexes *MRE11a*, *RAD50* und *NBS1* sowie *ATR*.

Hochreguliert wurden Gene bzgl. des DNA-Schadenssensors DNA-PK, *DNAPKcs* und *KU70* sowie *PARP-1*, die MMR-Gene *MSH2* und *MLH1*, das Gen für den Autophagie-Faktor *ATG3*, *CHK1*, das für die Reparatur von alkylierter DNA benötigte *MGMT*, das vor DNA-Einbau von oxidierten Nukleotiden schützende *MTH1* und das für die Reparatur von DNA-Interstrang-Crosslinks zuständige *FANCD2*. *FANCD2* ist auch in der Homologen Rekombination in der Reparatur von DSB beteiligt ist und mit den zugleich sehr deutlich transkriptionell hochregulierten Gene *BRCA2*, *RAD51* und *BRCA1* nach Translation interagieren kann.

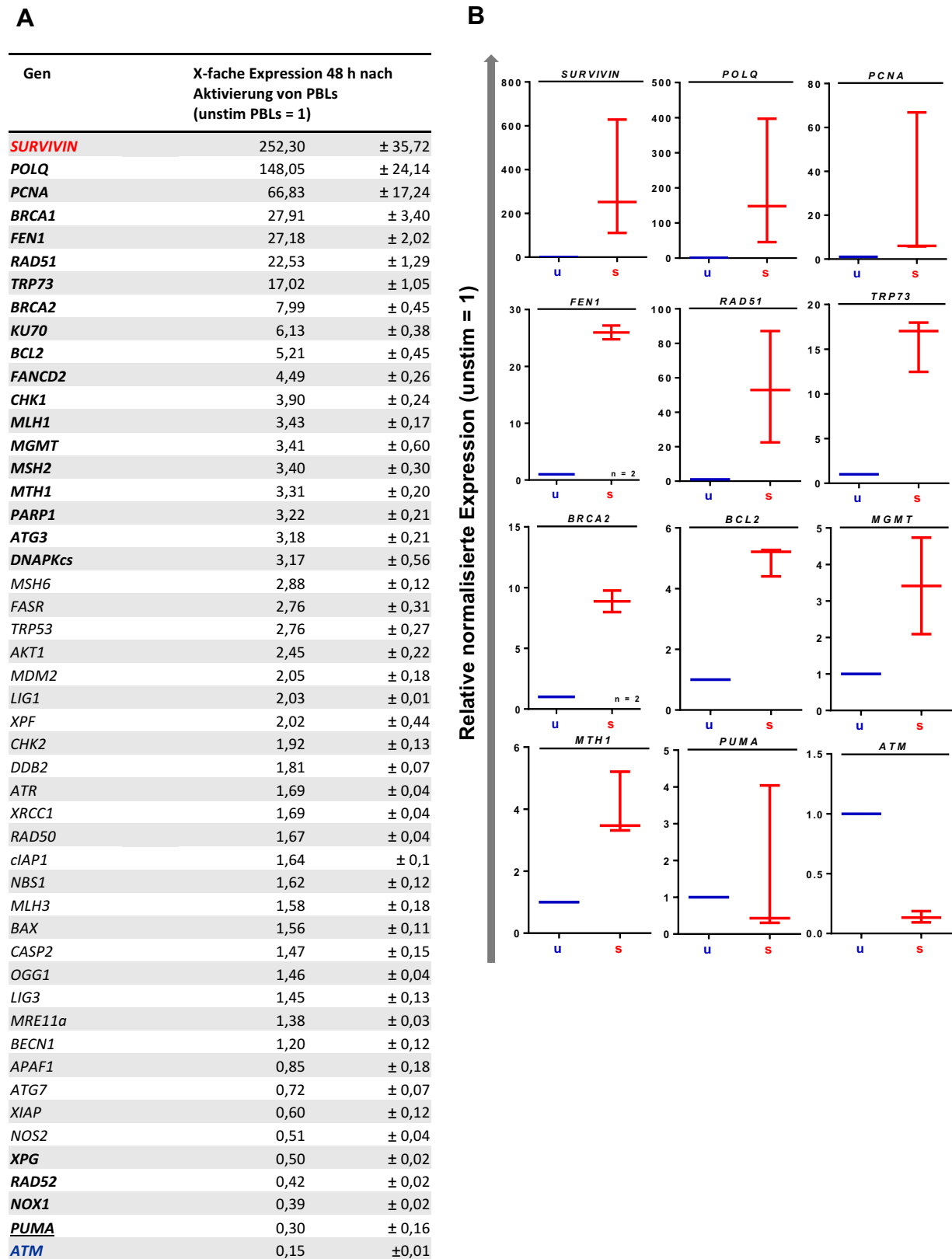


Abb. 3.47: Genexpressionsanalyse von unstimulierten vs. stimulierten Lymphozyten mittels Real-Time RT-PCR. A: X-fache Expression verschiedener Gene 48 h nach CD3/CD28-Stimulation von Lymphozyten im Vergleich zu nicht-stimulierten Lymphozyten (= 1), isoliert aus einem *Buffy Coat*. **B:** Verifizierung einiger Gene der Tabelle in weiteren *Buffy Coats* bis n = 3 (Mittelwerte).

Weiterhin wurde das *BCL-2*-Gen in stimulierten Lymphozyten stärker exprimiert, was Pro-Überlebenssignale fördern kann. Auch das Gen *TRP73* wird induziert, das für den Tumorsuppressor p73 codiert und Überlebenssignale wie auch Zelltod auslösen kann und u.a. mit ATM interagiert.

Weiterhin stark transkriptionell hochreguliert waren Gene für die Endonuklease *FEN1*, aktiv in der BER, NHEJ sowie in der DNA-Synthese in der S-Phase, sowie *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), welches nach Translation als „Gerüstprotein“ mit vielfältigen DNA-Reparaturproteinen interagiert und in der DNA-Replikation beteiligt ist. Bemerkenswert ist auch die hohe transkriptionelle Induktion der spezialisierten Polymerase *POLQ*, die im Bereich der DNA-Doppelstrangbruchreparatur aktiv ist und mit Resistenz gegenüber IR in Verbindung gebracht wird (Christmann et al., 2003). Das im Screen am stärksten induzierte Gen nach Aktivierung der Lymphozyten war *SURVIVIN*. Dies ist aufgrund der erhöhten Caspase-Aktivität in stimulierten Lymphozyten durchaus logisch, da nach Translation in das Protein Survivin die Caspase-Aktivität hemmt und somit ein Überleben der aktivierten Zellen durchsetzen kann.

Die Ergebnisse in Abb. 3.47 B zeigen die Mittelwerte von Daten aus bis zu drei *Buffy Coats* und bestätigen für die gezeigten Gene den Trend der Herauf- bzw. Herabregulation der Tabelle in Abb. 3.47 A. Eine Ausnahme bildet das Gen *PUMA*, das nach Stimulation von Lymphozyten aus einem von drei *Buffy Coats* hochreguliert wurde.

Nachfolgend wird der Effekt einer Hemmung von Survivin und MTH1 auf den strahleninduzierten Zelltod in Lymphozyten untersucht, da deren transkriptionelle Hochregulation in aktivierten Lymphozyten prägnant war und daher ihr Einfluss auf das Überleben oder Sterben nach Behandlung mit IR nicht auszuschließen ist.

3.19 Einfluss der Inhibition von Survivin auf die Strahlensensitivität von Lymphozyten

Survivin ist in stimulierten Lymphozyten im Vergleich zu unstimulierten Zellen transkriptionell stark hochreguliert. Dies müsste in zukünftigen Versuchen auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse verifiziert werden. Im Folgenden wurde der Effekt des Survivin-Inhibitors LLP3 auf den strahleninduzierten Zelltod in Lymphozyten untersucht (Abb. 3.48 A). Es konnte kein sensitivierender Effekt gegenüber IR in stimulierten Lymphozyten ermittelt werden. Survivin scheint also keinen schützenden Einfluss in stimulierten Lymphozyten bzgl. IR zu vermitteln. Es ist daher zu vermuten, dass Survivin die erhöhte Caspase-Aktivität in stimulierten Lymphozyten „abfängt“. Der Inhibitor hat auch keine Wirkung auf den IR-vermittelten Zelltod in unstimulierten Lymphozyten.

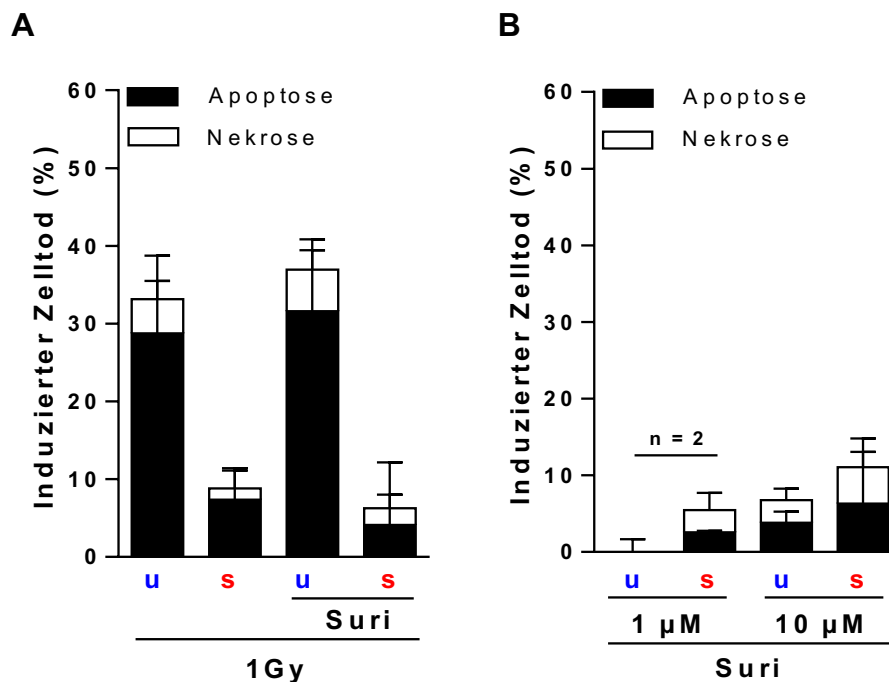


Abb. 3.48: Effekt der Survivin-Inhibition (Suri) auf unstimulierte und stimulierte Lymphozyten. **A:** Einfluss der Inhibition auf den strahleninduzierten Zelltod. Survivin-Inhibitor (LLP3, 10 µM) 1h vor Exposition mit 1 Gy. Zelltodmessung nach 24 h. Mittelwert, SD, n = 5 - 6. **B:** Zelltodinduktion nach 1 µM und 10 µM LLP3 nach 24 h. Mittelwert, SD, n = 3. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs.

In Abb. 3.48 B wird die Toxizität des Survivin-Inhibitors (ohne Exposition mit IR) dargestellt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass sich stimulierte Lymphozyten deutlich sensibler gegenüber einer Survivin-Inhibition verhalten als unstimulierte Zellen, da sie höhere Caspase-Aktivitäten zeigen. Dies konnte nach Behandlung mit 10 µM des Survivin-Inhibitors nicht bestätigt werden. Der induzierte Gesamtzelltod war nicht signifikant und lag bei unstimulierten Zellen bei 7 %, bei stimulierten bei 11 %.

Zusammengefasst zeigte die Hemmung von Survivin keinen Einfluss auf den IR-induzierten Zelltod in Lymphozyten.

3.20 Induktion von ROS und der Effekt der MTH1-Inhibition auf Lymphozyten

Nachfolgend wurden ROS in Lymphozyten am Durchflusszytometer bestimmt, um zu ermitteln, ob sich zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen die ROS-Level unterscheiden (Protokoll Kapitel 2.2.14). Dabei wurde jeweils der *Mean*-Wert eines Histogramms verwendet, der die mittlere Intensität eines Parameters einer Population darstellt. In diesem Fall war es die Positivität bzgl. des ROS-Farbstoffes CM H2DCFDA, die sich in einer Verschiebung der Population entlang der X-Achse nach rechts im Histogramm äußert. Im direkten Vergleich von CD3/CD28 aktivierten vs. nicht-aktivierten Lymphozyten zeigte die aktivierte Population signifikant mehr intrazelluläres ROS als nicht-aktivierte Zellen

(Abb. 3.49 A, rep. Histogramme, B, Quantifizierung der Mittelwerte von drei Experimenten). Dies kann auf die hohe metabolische Aktivität aktivierter Zellen und dem daraus resultierenden zellulären Stress zurückgeführt werden.

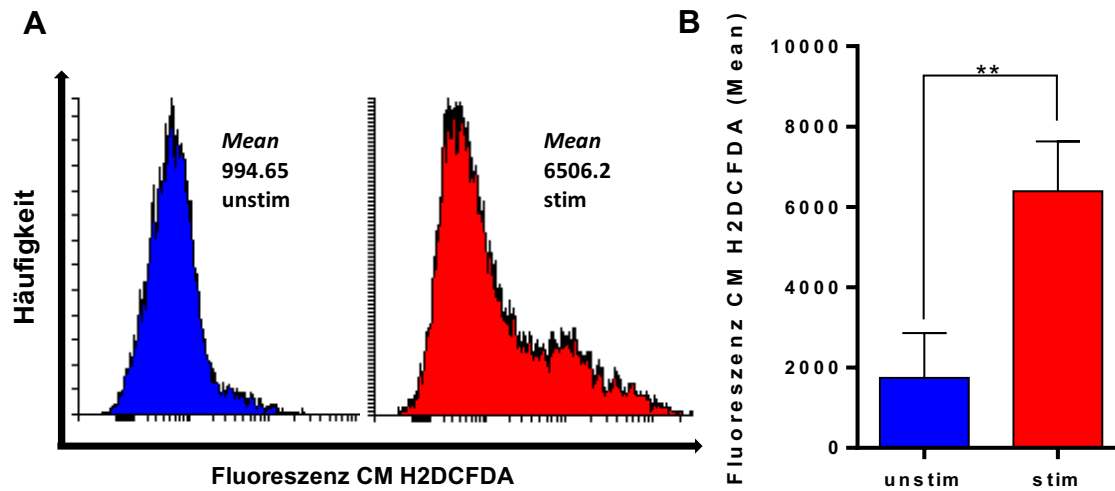


Abb. 3.49: Messung von intrazellulärem ROS in 48 h unstimulierten und stimulierten Lymphozyten.

A: Repräsentative Histogramme, ROS Farbstoff CM H2DCFDA. *Mean* (Mittlere Intensität des Gesamtsignals)

B: Quantifizierung des ROS Signals, t-Test, **p < 0,01, Mittelwert, SD, n = 3.

Zur Vollständigkeit wurde intrazelluläres ROS in bestrahlten unstimulierten vs. stimulierten Lymphozyten und die IR-vermittelte ROS-Induktion 1 min nach Behandlung mit 1 Gy gemessen (Abb. 3.50).

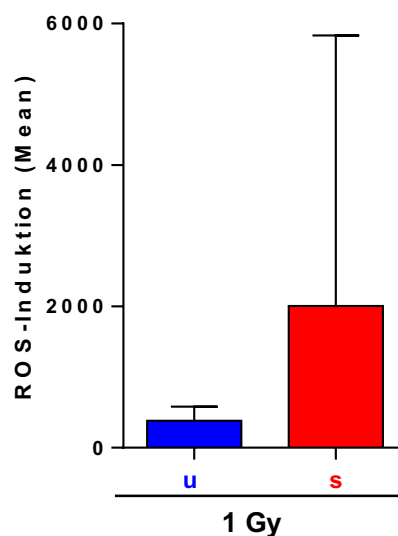


Abb. 3.50: Induzierte, intrazelluläre ROS-Level in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 1 min nach 1 Gy. Induktion von ROS anhand einer Analyse des Farbstoffs CM H2DCFDA als *Mean* dargestellt. Mittelwert, SEM, n = 3.

Nach 1 min erkennt man in beiden Populationen eine Induktion an intrazellulärem ROS. Dies ist in unstimulierten Lymphozyten sehr gering und für stimulierte Lymphozyten aufgrund der hohen interexperimentellen Varianz sehr schwankend. Vermutlich sind die durch IR-induzierte ROS zu kurzlebig für eine Analyse nach 1 min bzw. der Test generell zu unsensitiv.

Die erhöhte Menge an basalen, intrazellulären ROS in stimulierten Lymphozyten könnte auch die erhöhte Transkription von MTH1 erklären. MTH1 schützt das Genom vor oxidativen Schäden, indem es als Phosphatase oxidierte Nukleotide hydrolysiert (Fujikawa et al., 2001). Um eine mögliche Einflussnahme von MTH1 auf den IR-induzierten Zelltod zu analysieren, wurden die Zellen mit dem MTH1-Inhibitor TH588 vorbehandelt.

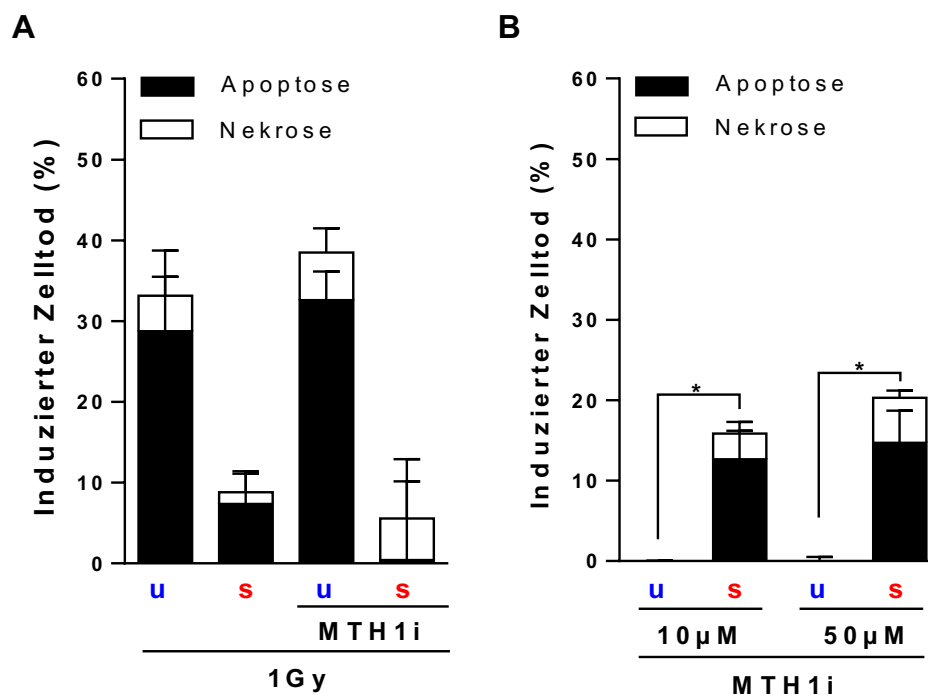


Abb. 3.51: Effekt der MTH1-Inhibition auf den Zelltod unstimulierter und stimulierter Lymphozyten.

A: Einfluss der Inhibition auf den strahleninduzierten Zelltod. MTH1-Inhibitor (TH588, 10 µM), Vorbehandlung 1 h vor Exposition mit 1 Gy. Zelltodmessung nach 24 h. Mittelwert, SD, n = 4 - 6. **B:** Zelltodinduktion 24 h nach Behandlung mit 10 µM und 50 µM TH588 24. t-Test, *p < 0,05. Mittelwert, SD, n = 4. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs.

Eine Hemmung von MTH1 hatte keinen Effekt auf den IR-induzierten Zelltod von Lymphozyten (Abb. 3.51 A, dies wurde auch mit 50 µM TH588 getestet, hier nicht gezeigt). Somit scheint IR keine Toxizität durch Einbau oxidierte Nukleotide in die DNA zu vermitteln. Interessant ist jedoch die Toxizität des MTH1-Inhibitors auf Lymphozyten, da sich hier signifikante Unterschiede im induzierten Zelltod zwischen beiden Populationen ergaben (Abb. 3.51 B). Demnach sind stimulierte Lymphozyten deutlich sensibler gegenüber TH588 als unstimulierte Lymphozyten und könnte auf einen vermehrten Einbau des z.B. hoch-toxischen 8-Oxo-

Guanins in die replizierende DNA stimulierter Zellen zurückgeführt werden. Aufgrund der erhöhten basalen, intrinsische ROS-Menge in stimulierten Lymphozyten (Abb. 3.49) und deren toxisches Potential über Oxidation von Nukleotiden kann MTH1 als eine Art Schutzfaktor in der aktivierten Population angesehen werden.

3.21 Toxizität des Radiomimetikums CDT auf Lymphozyten

CDT (*cytolethal distending toxin*) wird als sog. Radiomimetikum beschrieben, da es ähnlich wie IR aufgrund der Endonukleaseaktivität der B-Untereinheit DSB erzeugt und eine entsprechende DNA-Schadensantwort hervorruft (Fahrer et al., 2014). Die Abb. 3.52 A zeigt die Zelltodinduktion geringer Mengen von CDT im Vergleich zu 1 Gy exponierten Lymphozyten (linker Abschnitt der Grafik). Im Gegensatz zu IR zeigten jedoch stimulierte Lymphozyten eine signifikant höhere Zelltodinduktion, hauptsächlich in Form der Apoptose, als unstimulierte Lymphozyten. Unstimulierte Zellen induzierten bei 0,00425 µg/ml bzw. 0,034 µg/ml nur 3 bzw. 4 % Zelltod, stimulierte Zellen hingegen 26 und 46 %.

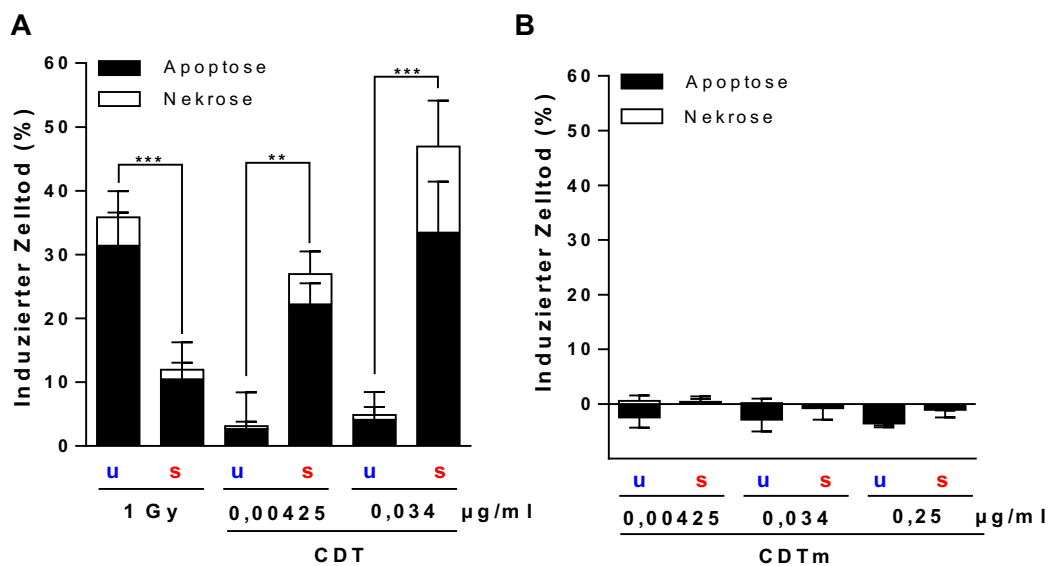


Abb. 3.52: Zelltodinduktion in Lymphozyten 24 h nach CDT-Behandlung. **A:** Induktion des Zelltodes nach CDT-Behandlung (rechts) im Vergleich zu 1 Gy exponierten Zellen (links). **B:** Induktion des Zelltodes nach Behandlung mit dem in der B-Untereinheit mutierten und katalytisch inaktiven CDTm. t-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001, Mittelwerte, SD, n = 3 - 5. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs.

Die Toxizität konnte eindeutig auf die Endonukleaseaktivität des CDT zurückgeführt werden, da das in der B-Untereinheit mutierte CDTm keinen Zelltod in den Lymphozyten auslöste (Abb. 3.52 B).

Desweiteren wurden die durch CDT-induzierten DSB in Form einer γH2AX-Färbung ermittelt.

Die immunhistochemischen Färbungen von γ H2AX in CD3+ T-Zellen zeigten 4 und 24 h nach CDT-Behandlung signifikant mehr DNA-Schäden in stimulierten als in unstimulierte Zellen (Abb. 3.53 A, für repräsentative Bilder; B, Quantifizierung der mittleren γ H2AX-Foci-Intensität). In unstimulierten T-Zellen blieb das Signal von γ H2AX fast vollständig aus.

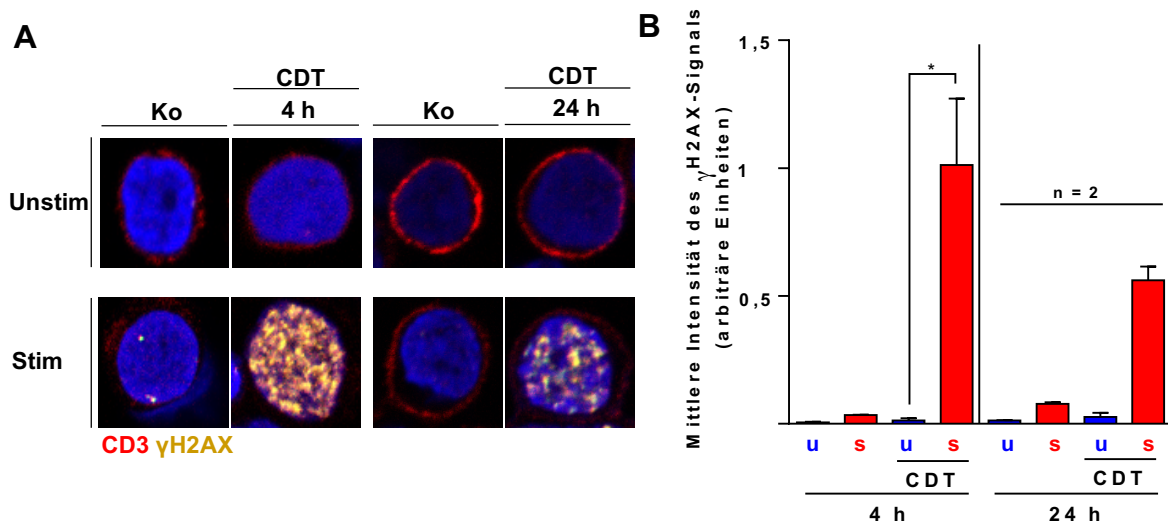


Abb. 3.53: Immunhistochemische Färbung von γ H2AX in unstimulierten und stimulierten CD3+ T-Zellen, unbehandelt (Ko) bzw. 4 und 24 h nach Behandlung mit 0,034 μ g/ml CDT. A: Repräsentative Bilder aufgenommen am konfokalen Mikroskop, CD3, rot; γ H2AX, gelb; Kern, blau. **B:** Quantifizierung der mittleren Intensität des γ H2AX-Signals. t-Test, * $p < 0,05$. Mittelwert, SEM, $n = 2 - 3$.

Vermutlich kann CDT in stimulierten Zellen besser die DNA erreichen als in unstimulierten Zellen. Alternativ kann angenommen werden, dass die durch CDT-induzierten SSB und DSB infolge eines Replikationsstress in den proliferierenden, stimulierten Lymphozyten zum Zelltod führen. Dies müsste in weiteren Experimenten untersucht werden, um mögliche Effekte von CDT hinsichtlich einer Immuntoxizität besser verstehen zu können.

3.22 Zelltodinduktion in Lymphozyten durch Temozolomid

Das alkylierende Agens TMZ löst in proliferierenden Zellen nach repetitiven Mismatchreparaturzyklen DSB und somit Zelltod aus. Das kann auch in nicht-proliferierenden Zellen nach hohen Dosen TMZ aufgrund überlappender SSB stattfinden. Resistenzfaktor dieser durch TMZ ausgelösten Alkylierungen ist MGMT, welches durch O^6 BG gehemmt werden kann und zu einer Sensitivierung der Zelle gegenüber TMZ führt. In Abb. 3.54 A ist die Zelltodinduktion 72 h nach niedrigen und hohen Dosen TMZ ohne eine Hemmung des auch in Lymphozyten vorkommenden MGMT durch O^6 BG dargestellt. TMZ induzierte 72 h nach einer Dosis von 150 μ M lediglich 10 % Zelltod in Lymphozyten, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten festgestellt werden

konnten. Wurde MGMT durch eine Vorbehandlung mit O⁶BG gehemmt, so zeigten insbesondere stimulierte Lymphozyten eine deutliche, signifikante Induktion des Zelltodes bereits bei einer Dosis von 6,25 μ M TMZ auf 12 %, von 12,5 μ M auf 27 % und 25 μ M auf 41 % (Abb. 3.54 B). Auffallend ist, dass bei den sehr geringen Dosen bis 25 μ M TMZ insbesondere die Nekrose eingeleitet wird. Unstimulierte Zellen untergingen keinen Zelltod.

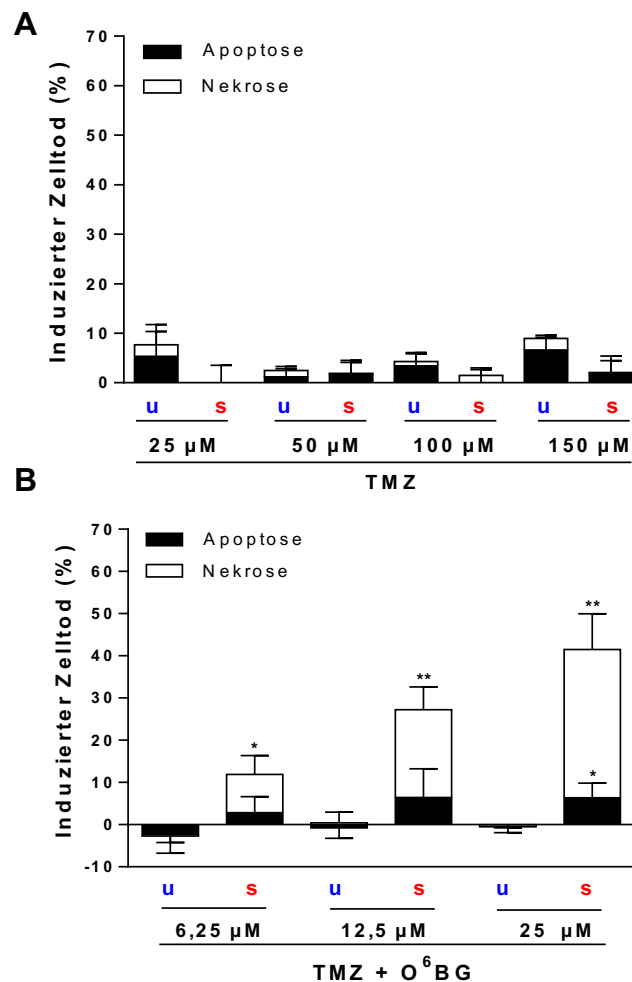


Abb. 3.54: Zelltodinduktion (AnnexinV/PI) von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 72 h nach Behandlung mit Temozolomid. A: Ohne Vorbehandlung mit O⁶BG. **B:** Mit O⁶BG-Vorbehandlung. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. t-Test, *p < 0,05, **p < 0,01. Mittelwert, SD, n = 3 - 4.

Das Auslösen des Zelltodes durch TMZ wurde auch in zuvor aufgereinigten und unstimulierten bzw. stimulierten Treg, Th und CTL untersucht (Abb. 3.55 A - C). Die Zellen wurden vor der Behandlung mit TMZ mit O⁶BG inkubiert. Auch hier waren stimulierte Zellen signifikant sensibler als unstimulierte Zellen und leiteten neben Nekrose auch deutlich Apoptose ein. Da es sich hier um eine Dosis von 50 μ M TMZ handelte (Abb. 3.54 B, TMZ-Dosen bis maximal 25 μ M), induzieren stimulierte Zellen vermutlich bei höheren TMZ Dosen in Kombination mit O⁶BG auch vermehrt Apoptose. So ist in Abb. 3.54 B bei 25 μ M TMZ ein signifikanter Unterschied in

der Apoptose zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten erkennbar, nicht aber nach einer Behandlung von 6,25 und 12,5 μ M TMZ.

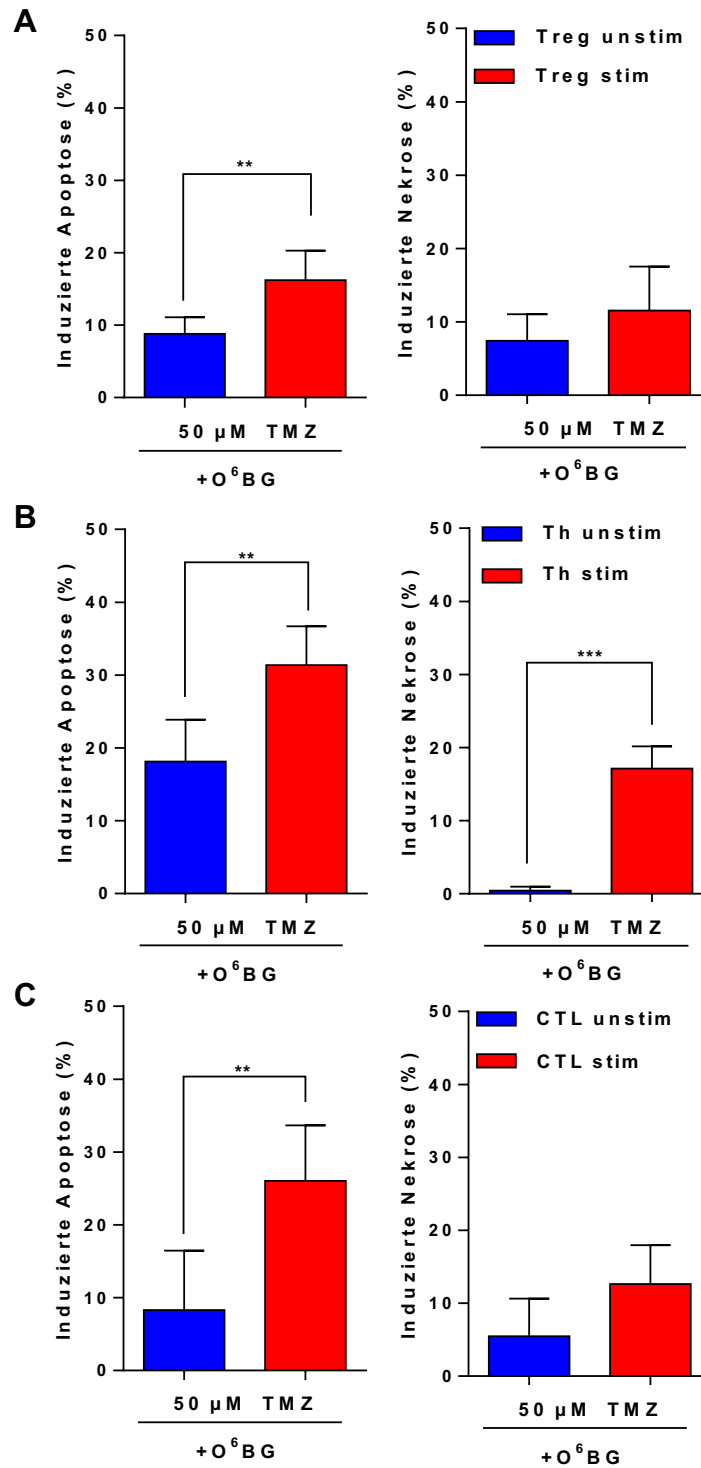


Abb. 3.55: Zelltodinduktion durch TMZ in aufgereinigten und unstimulierten bzw. stimulierten A: Treg, B: Th und C: CTL. Annexin-positiv/PI-negativ (Apoptose), Annexin-positiv/PI-positiv (Nekrose). Vorbehandelt mit O^6BG . Messung nach 72 h. t-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001. Mittelwert, SD, n = 5.

Auch bei der Fragmentierung der DNA nach TMZ (SubG1-Assay) zeigten stimulierte Treg, Th und CTL signifikant höhere, induzierte SubG1-Fractionen als unstimulierte Zellen (Abb. 3.56 A - C). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen T-Zellsubpopulationen waren nicht erkennbar.

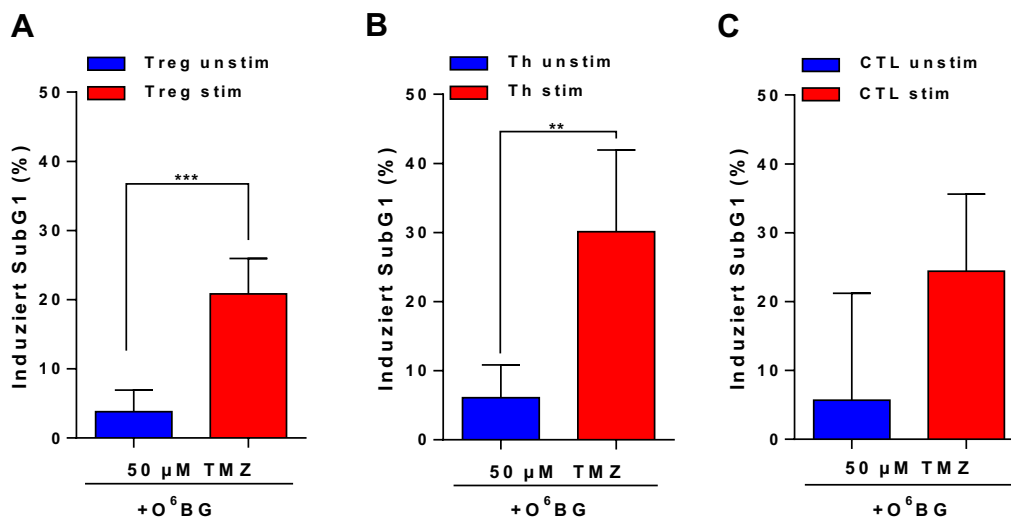


Abb. 3.56: Messung der induzierten SubG1-Fraktion nach 72 h in TMZ-behandelten A: Treg, B: Th und C: CTL, unstimuliert und CD3-/CD28-stimuliert. t-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001. Mittelwert, SD, n = 5.

Für die durch O⁶-Methylguanin induzierte Toxizität ist DNA-Replikation notwendig, da sich nur durch diesen Prozess DSB ausbilden können. DNA-Replikation ist nur in stimulierten Lymphozyten vorhanden, was erklären könnte, warum die Toxizität von TMZ in stimulierten höher ist als in unstimulierten Zellen.

3.23 Zelltodinduktion in Lymphozyten durch Mafosfamid

Mafosfamid (in den Graphen als MAF abgekürzt) ist ein Derivat von Cyclophosphamid, ein therapeutisch breit eingesetztes Chemotherapeutikum und Immunsuppressivum, das *DNA Interstrang-Crosslinks* bildet. Aufgrund seiner Struktur ist für Mafosfamid keine Verstoffwechslung durch CYP-Enzyme nötig und kann so in Zellen ohne metabolische Kompetenz verwendet werden. Es wurde untersucht, ob nicht-stimulierte versus stimulierte Lymphozyten Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Mafosfamid aufweisen. Ähnlich zur Strahlenwirkung waren unstimulierte Lymphozyten signifikant sensibler als stimulierte Lymphozyten insbesondere gegenüber niedrigen Dosen an Mafosfamid (Abb. 3.57). Schon geringe Dosen von 0,1 bis 1 µg/ml Mafosfamid induzierten eine höhere Induktion von Apoptose wie auch Nekrose in unstimulierten Lymphozyten. Erst bei einer hohen Dosis von 1,5 µg/ml Mafosfamid stieg der Zelltod auch in stimulierten Lymphozyten deutlich an (nach 1 µg/ml in unstimulierten 50 %, in stimulierten Zellen 12 % Zelltod, nach 1,5 µg/ml in unstimulierten 53

%, in stimulierten Zellen 33 % Zelltod). Ähnlich wie im Fall der IR sind aktivierte und proliferierende Zellen resistenter gegenüber ein DNA-modifizierendes Ereignis.

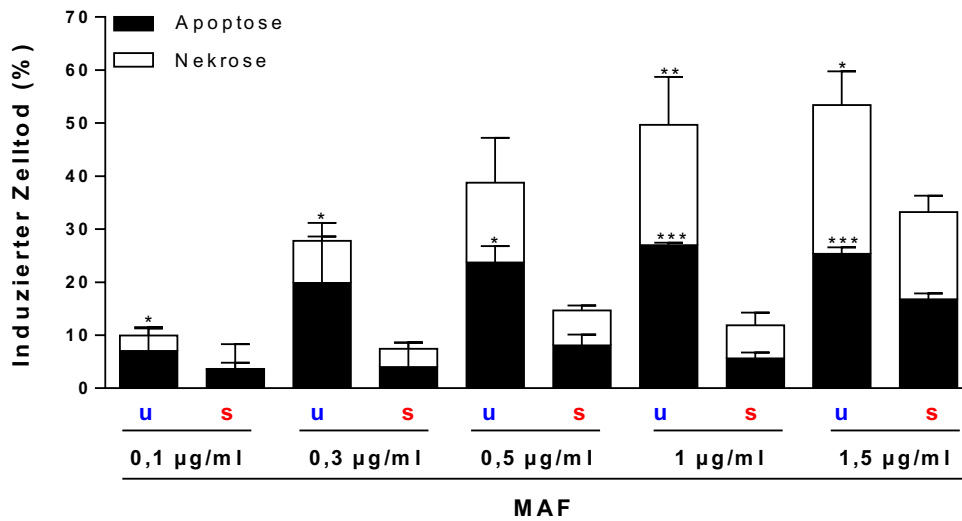


Abb. 3.57: Zelltodinduktion von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 24 h nach Behandlung mit Mafosfamid. AnnexinV/PI-Färbung in PBLs. t-Test, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Mittelwert, SD, n = 3.

Es konnte gezeigt werden, dass bei geringen Dosen Mafosfamid insbesondere Treg signifikant sensibler sind als Th und CTL, was in Folge einer Niedrigdosis-Therapie zu einem *Boost* der Immunantwort führen kann (Abb. 3.58 A). Die erhöhte Sensitivität von Treg ist sehr wahrscheinlich auf eine Defizienz in der ICL-Reparatur in Treg zurückzuführen und wird im Diskussionsteil näher erläutert (Heylmann et al., 2013). Interessanterweise werden auch Treg resistenter gegenüber Mafosfamid, wenn sie zuvor stimuliert wurden (Abb. 3.58 B).

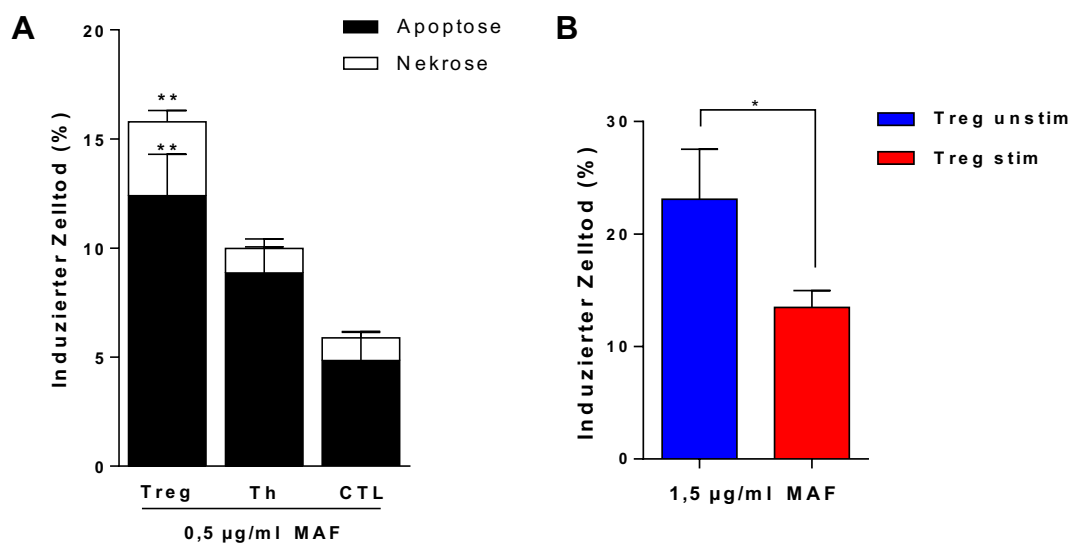


Abb. 3.58: Zelltodinduktion von aufgereinigten Treg, Th und CTL 24 h nach Behandlung mit Mafosfamid. A: AnnexinV/PI-Färbung. One-Way ANOVA. **p < 0,01, Signifikanz bzgl. Apoptose zu CTL, Signifikanz bzgl. Nekrose zu Th und CTL. Experiment zusammen mit Dr. Martina Bauer durchgeführt. Mittelwert, SEM, n = 5. B: Vergleich des induzierten Zelltodes (AnnexinV-positiv) von unstimulierten und stimulierten Treg nach Mafosfamid-Behandlung. t-Test, *p < 0,05. Mittelwert, SD, n = 3.

3.24 Zelltodinduktion in Treg, Th und CTL durch Nimustin und Mitomycin C

Das alkylierende Agens Nimustin, das in der Hirntumorthherapie verwendet wird, wurde auf Toxizität in Treg, Th und CTL überprüft. Die unterschiedlichen Blutzellpopulationen zeigten eine deutliche Zelltodinduktion nach Behandlung mit 50 bzw. 100 μM Nimustin (Abb. 3.59 A). So leiteten Treg nach 100 μM Nimustin 17 %, Th 21 % und CTL 27% Zelltod ein. Signifikante Unterschiede zwischen den T-Zellsubpopulationen konnte aber aufgrund einer hohen interexperimentellen Varianz nicht festgestellt werden.

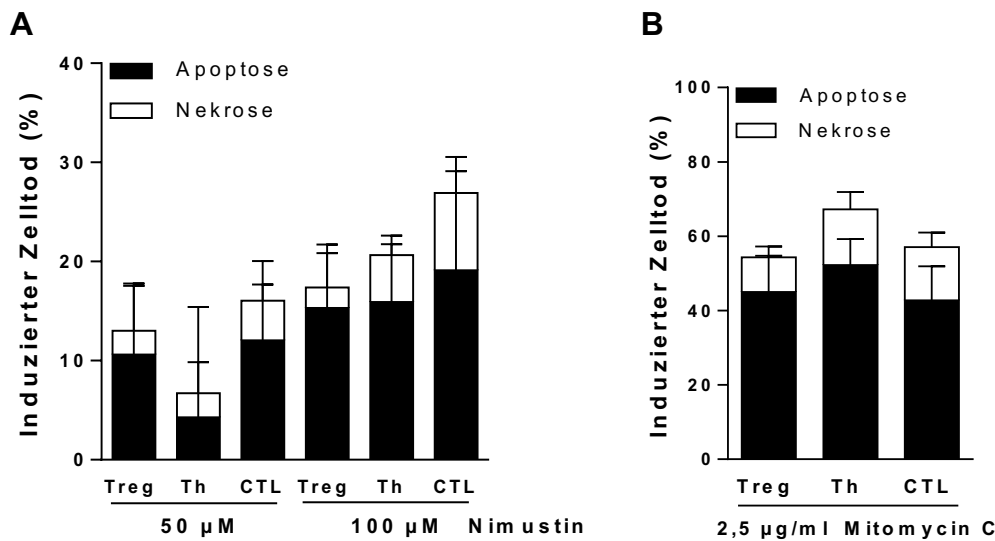


Abb. 3.59: Zelltodinduktion durch Nimustin (A, nach 72 h) und Mitomycin (B, nach 48 h) in aufgereinigten Treg, Th und CTL. AnnexinV/PI-Färbung. Mittelwert, SD, n = 3.

Die Behandlung mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ des zytotoxischen Antibiotikums Mitomycin C, welches ähnlich wie Mafosfamid DNA-Strangverknüpfungen bildet, induzierte in allen drei T-Zellsubpopulationen eine erhebliche Induktion des Zelltodes, hauptsächlich von Apoptose (Abb. 3.59 B). Die Dosis von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C liegt im Bereich der Plasmakonzentration, die Patienten nach intravenöser Gabe maximal erreichen (0,4 – 3,2 $\mu\text{g/ml}$, Referenz eMC). Signifikante Unterschiede zwischen Treg, Th und CTL in der Zelltodinduktion waren nicht ersichtlich und lag bei 54 % in Treg, 67 % in Th und 57 % in CTL. Zukünftig könnten Zelltodmessungen auf den Dosisbereich von 0,1 – 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Mitomycin C erweitert werden, um mögliche Unterschiede in der Zelltodinduktion von Treg, Th und CTL hinsichtlich geringer Dosen zu validieren.

4 Diskussion

4.1 Lymphoide Immunzellen sowie CD34+ Vorläuferzellen sind sensitiver gegenüber ionisierender Strahlung als myeloide Immunzellen

Mittels AnnexinV-Messungen konnte gezeigt werden, dass Blutzellen wie T- (Th, CTL), B- und NK-Zellen, die aus der lymphoiden Reihe entstammen, nach ionisierender Strahlung signifikant mehr Zelltod untergehen als Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (Abb. 3.1). Dies war schon bei sehr geringeren Dosen von 0,125 und 0,25 Gy deutlich zu verzeichnen. Gleiches gilt für CD34+ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut, die sich als sehr strahlensensitiv zeigten. Innerhalb der lymphoiden Reihe zeichneten sich vor allem Th und CTL als auch die B-Zellen als äußerst strahlensensitiv heraus. Mit Blick auf die myeloide Reihen sind Monozyten deutlich sensitiver als die aus ihnen ausdifferenzierten Makrophagen und DCs. Die Ergebnisse, die erstmalig den Vergleich von Th, CTL, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DCs und CD34+ Vorläuferzellen innerhalb eines Experiments zeigen, bestätigen z.T. die Daten aus dem Review Heylmann *et al.* (Abb. 4.1), die eine Zusammenfassung mehrerer unterschiedlicher Beobachtungen bzw. Studien zeigt (Heylmann *et al.*, 2014). Die Studien beschreiben im Gesamtvergleich, dass vor allem frühe Stammzellen, Th, CTL und vor allem B-Zellen sehr strahlensensitiv sind, Monozyten und neutrophile Granulozyten je nach Vergleich eine mittlere Sensitivität zeigen, Treg, Makrophagen, DCs, NK, Thrombozyten (und deren Vorläufer die Megakaryozyten) und Erythrozyten resistenter gegenüber IR sind. Die Ergebnisse beruhen z.T. auf Beobachtungen von Blutbildern und viele Vergleiche von Strahlensensitivitäten wurden meist innerhalb von T- und NK-Zellpopulationen vorgenommen (Heylmann *et al.*, 2014). Keine Daten zur Strahlensensitivität liegen derzeit für basophile oder eosinophile Granulozyten vor. Erythrozyten zeigen erhöhte Resistenz, vermutlich aufgrund des Fehlens eines DNA beinhaltenden Zellkerns, was wiederum IR-induzierte DNA-Schäden als Hauptursache für die Sensitivität gegenüber IR beschreibt (Kollmann *et al.*, 1969; Krokosz & Szweda-Lewandowska, 2006). So sind die Vorläufer der Erythrozyten im Knochenmark empfindlicher gegenüber IR als ausgereifte Erythrozyten. Diese Vorläufer besitzen noch einen Zellkern mit DNA (Ji, *et al.*, 2011). Weiterhin erscheinen die sehr frühen totipotenten und multipotenten CD34+CD38-Stammzellen strahlensensitiver als die weiter ausgereiften CD34+CD38+ oligopotente Vorläufer (Hayashi *et al.*, 2004). Daher kann die erhöhte Strahlensensitivität in HSC und MPPs im Vergleich zu oligopotente Vorläuferzellen auf eingeschränkte DSB-Reparatur, erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci und eine erhöhte Expression von p53 und des Apoptose-stimulierenden Proteins von p53 ASPP1 zurückgeführt werden. Eine Inaktivierung von p53 und Überexpression des anti-apoptotischen BCL-2 konnte HSC vor IR-induziertem Zelltod schützen (Milyavsky *et al.*, 2010). Desweiteren können eine eingeschränkte NHEJ, die

daraus resultierenden größeren Mengen an DSB und die dadurch vermittelte p53 Aktivierung als Auslöser des IR-induzierten Zelltods in HSCs und MPPs angeführt werden. Dies zeigt, dass auch vor allem im sog. Stammzellmilieu deutliche Unterschiede in der Strahlensensitivität vorliegen. Zudem zeigen CFU-GM eine höhere Resistenz gegenüber IR im Vergleich zu CFU-GEMM, was daraus schließen lässt, dass während der Ausdifferenzierung von CFU-GEMM zu CFU-GM eine Strahlenresistenz erworben wird (Akushevich et al., 2011; Kato et al., 2011; Kato et al., 2013; Oriya et al., 2008).

Unklar ist weiterhin, ob die direkten Vorläufer der Granulozyten (Neutrophile) und Monozyten wie CFU-G oder CFU-M strahlensensitiv oder –resistent sind. Gleiches gilt für die direkten Vorstufen der T- und B-Zellen Pro-T, Pro-B und dem frühen Vorläufer CLP (*common lymphoid progenitor*). Vergleicht man unterschiedliche Beobachtungen, so zeichnet sich folgendes Ranking ab: Pro-T > Pro-B = CFU-G > CFU-M = CFU-Eo (Heier et al., 1975; Heylmann et al., 2014). Dies würde auch das Blutbild in Abb.1.3 suggerieren (Plowman, 1983). Hier zeigen Monozyten wellenartige Auf- und Ab-Bewegungen in der Zellzahl mit einem Einpendeln auf einem Basallevel während der Therapie. Dies deutet auf einen strahlenresistenten Vorläufer CFU-M, der effizient Monozyten nachliefert und einer Depletion von Monozyten entgegenwirkt. Ähnliches könnte auch für neutrophile Granulozyten gelten, da auch hier eine extreme Abnahme in der Zellzahl wie bei Lymphozyten nicht zu beobachten ist. Lediglich Lymphozyten zeigen eine massive Depletion im Blut, entweder durch die hohe Sensitivität ausgereifter T- und B-Zellen, vermutlich aber auch aufgrund hoch sensibler Vorläufer wie CLP, Pro-T und Pro-B, die einer Depletion ausgereifter Lymphozyten nicht entgegenwirken können (Heylmann et al., 2014). In zukünftigen Experimenten müsste überprüft werden, ob sich die Vorläufer CFU-GEMM, CFU-M, CFU-G und CLP in der IR-vermittelten Zelltodinduktion unterscheiden. Hierfür müssten die Zellen aus menschlichem Knochenmark mit magnetischen *Beads* oder durch ein *Sorting* am FACS isoliert werden und der IR-induzierte Zelltod mittels AnnexinV/PI-Färbung ermittelt werden. Dadurch könnte der Effekt von IR auf das blutbildende System bzw. der therapeutische Einfluss von Strahlung auf das Immunsystem noch besser vorhergesagt werden.

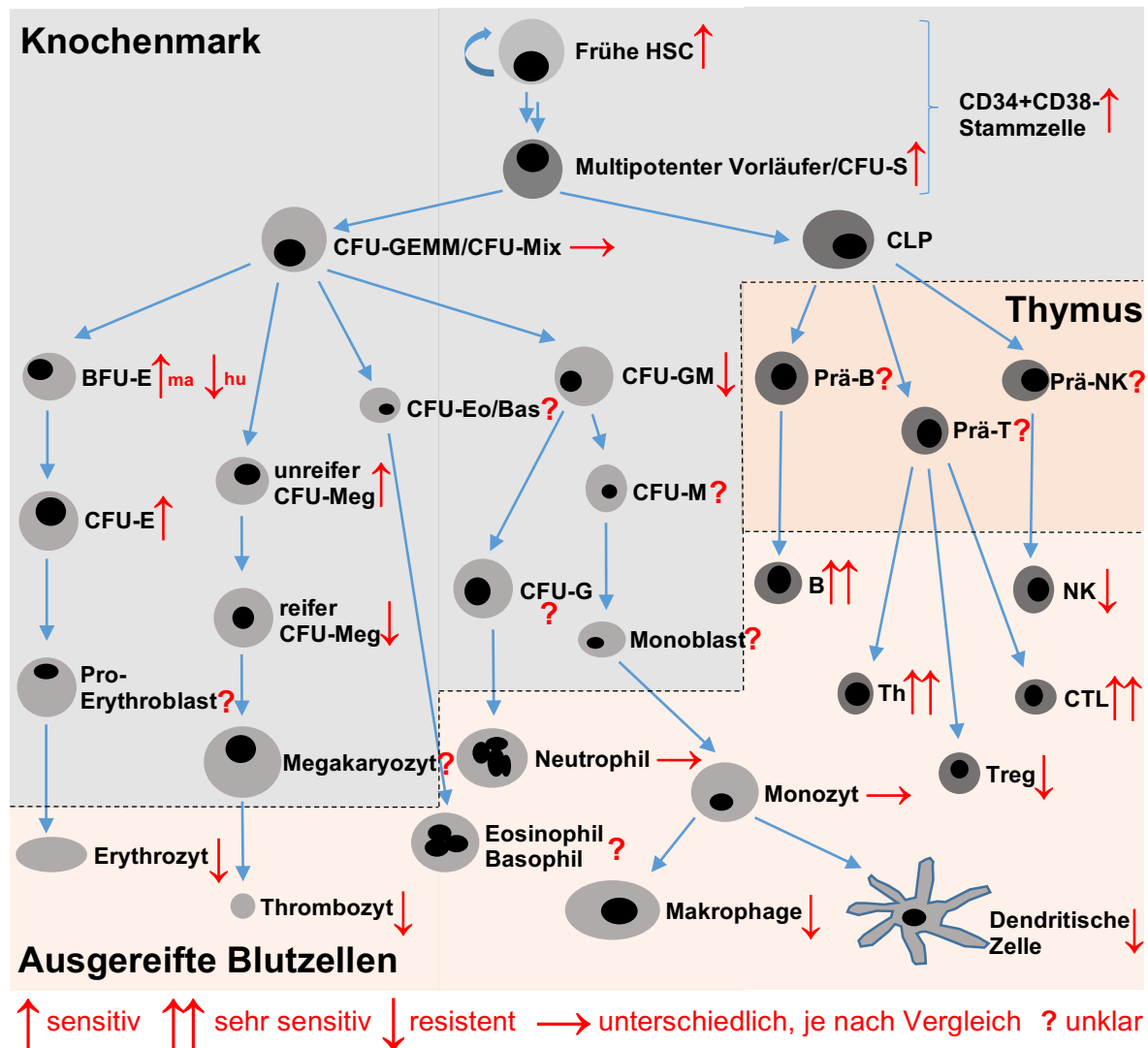


Abb. 4.1: Strahlensensitivität hämatopoetischer Zellpopulationen im Knochenmark und der Peripherie zusammengefasst aus unterschiedlichen Studien der letzten Jahrzehnte. CFU-GEMM sind weniger strahlensensitiv als frühere HSCs, aber strahlensensitiver als CFU-GM. Die Vorläufer CFU-GEMM, CFU-Mix und CFU-S sind phänotypisch schwer voneinander zu unterscheiden. Weiterhin zeigen Monozyten und neutrophile Granulozyten eine höhere Strahlenresistenz als Lymphozyten, jedoch eine höhere Sensitivität im Vergleich zu Makrophagen, Dendritischen Zellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Hohe Sensitivität gegenüber Strahlung zeigen insbesondere Th, CTL und B-Zellen und frühe HSCs sowie CD34+ Vorläuferzellen. ma (Maus), hu (Human). Modifiziert aus Heylmann et al., 2014.

Die unterschiedlichen Sensitivitäten spielen u.a. eine wichtige Rolle im Bereich der Therapie von malignen Erkrankungen, da sie einen signifikanten Einfluss auf die antitumorale Immunantwort hervorrufen können. So sind Treg, die innerhalb der T-Lymphozyten einen strahlenresistenten Phänotyp zeigen (Abb. 3.4), „Tumor-schützende“ Zellen, da sie vor allem strahlensensitive Effektor T-Zellen (Th, CTL) und NK-Zellen inhibieren (Gajewski et al., 2013; Kachikwu et al., 2011; Winzler et al., 2011). Dies kann zu einem Ungleichgewicht der Blutzellpopulationen in Richtung immunvermittelter Tumorprotektion verschieben, was einen negativen Einfluss auf die Effizienz der Strahlentherapie nehmen könnte (Barker et al., 2015). Die nach Strahlung überlebenden Tumorzellen sind somit in einem eher immunprotektiven

Milieu geschützt (Jacobs et al., 2010). In Abb. 3.4 konnte zwar gezeigt werden, dass Treg signifikant resistenter gegenüber IR sind als Th oder CTL, Treg jedoch deutlich mehr Zelltod einleiten als z.B. Monozyten. Inwieweit dieser Treg-Effekt nun relevant in der Krebstherapie ist, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Generell ist der Einfluss von IR auf Blutzellen von sehr vielen Faktoren abhängig, wie z.B. das Neutralisieren bzw. Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies oder Stickstoffspezies und der Induktion und Reparatur des DNA-Schadens. Insbesondere die DNA ist das Hauptziel von IR; die DNA-Reparatur ist die Hauptabwehr vor gentoxischen Wirkungen und auch für Einleitung von Zelltodsignalen verantwortlich (Roos & Kaina, 2013; Roos et al., 2016). Bei diesem Hintergrund ist es von äußerster Wichtigkeit, die Kapazität der DNA-Reparatur der verschiedenen Blutzellpopulationen zu untersuchen. Denn vor allem die Signalwege der DNA-Schadensantwort können Auslöser weiterer vielfältiger Signalwege im Bereich der Apoptose, Nekrose, Nekroptose, Autophagie, Pyroptose und weiterer Zelltodwege sein (Fatokun, et al., 2014; Miao et al., 2010; Roos et al., 2016). Da diese Signalwege gezielt pharmakologisch aktiviert wie auch inhibiert werden können, ist ein solches Wissen insbesondere für Behandlungsstrategien wie passive oder aktive Immuntherapie in Kombination mit ionisierender Strahlung und chemischen Genotoxinen zur Optimierung der Krebstherapie wichtig!

NK-Zellen wurden im Review (Heylmann et al. 2014) als eher strahlenresistent eingeordnet, was in der hier gezeigten *in vitro* Studie nicht bestätigt werden konnte (siehe Abb. 3.1). Auch hier zeigten NK-Zellen eine deutliche Zelltodinduktion nach IR ähnlich wie T-Zellen und konnten nicht von den anderen lymphoiden Zellen in ihrer Sensitivität abgegrenzt werden. Hier sollten in zukünftigen Versuchen vermehrt NK-Subpopulationen (CD56+ und CD16+) untersucht werden. Da NK-Zellen über CD56 *Beads* aufgereinigt wurden und einen gewisse Positivität für CD3 zeigten (im Anhang Abb. 6.1), müsste in weiteren Versuchen die NK Zellisolation optimiert werden, um ausschließlich reine CD56- bzw. CD16-positive NK-Zellen zu erhalten (Abb. 3.1). Auch für Granulozyten (Neutrophile) konnte in diesen Versuchen keine Strahlensensitivität festgestellt werden, da sie aber auch schon basal nach 24 h stark erhöhte Zelltodwerte zeigten (Abb. 3.3). Trypanblaufärbungen zeigten nach 6, 18 und 24 h einen deutlichen, zeitabhängigen Anstieg basaler Zelltodwerte, wobei eine Exposition mit IR (0,25 – 2 Gy) die Zelltodwerte nicht beeinflusste (Haak, Masterarbeit 2016). Granulozyten stellen in diesem Zusammenhang ein „Mysterium“ dar. Sie zeigen DNA induzierte Schäden (nachgewiesen über *Comet Assays*) und eine verminderte Reparatur dieser Schäden, jedoch keine γ H2AX-Signale oder sonstige Expressionen von Proteinen der DDR wie ATM, ATR, DNA-PKcs oder MGMT (Haak, Masterarbeit 2016). Granulozyten werden als ausgereifte Blutzellen vom Knochenmark in den Blutkreislauf entlassen, wo sie eine sehr geringe Lebenszeit von nur wenigen Tagen besitzen. Ihr Schicksal ist es zu sterben, jedoch als eine

Art „Minen“ im Blutkreislauf kurzzeitig funktionsfähig zu bleiben und über NETosis, dem Auswerfen der sog. DNA-Netze auf Pathogene, reagieren zu können. Des Weiteren besitzen Granulozyten als Hauptanteil weißer Blutkörperchen einen erhöhten *Turn Over* und werden sehr schnell nachgebildet. Granulozyten differenzieren nicht weiter aus und proliferieren nicht. (Bartova et al., 2001; Brinkmann et al., 2004; Cartwright et al., 1964; Dancey et al., 1976; Dresch et al., 1975; Pillay et al., 2010; Steinbach et al., 1979; Theilgaard-Monch et al., 2005). Dies ist auch für Monozyten zutreffend. Sie besitzen eine kurze Lebensspanne im Blut und differenzieren bei Immunreaktionen zu Makrophagen oder DCs aus, ohne dabei zu proliferieren (Bauer et al., 2011; van Furth et al., 1979). Aufgrund ihrer geringen Lebenszeit und Teilungsunfähigkeit ist es für die Zellen vermutlich „sinnvoll“, ihre Energie bzw. den Metabolismus nicht auf DNA-Reparatur bzw. DNA-Schadensabhängiger Zelltodinduktion zu fokussieren. Die Gefahr der Manifestation einer Mutation und Entartung der Zelle ist im Kontext der „vorprogrammierten“ kurzen Lebenszeit ohne Proliferation nicht gegeben.

Anders sieht es für HSCs, CD34+ Vorläuferzellen oder T- und B-Zellen aus. Diese sind deutlich langlebiger, sind in der Lage zu proliferieren und deutlich empfänglicher in der Ausprägung einer IR-induzierten Mutation, falls sie nach Kontakt mit IR nicht sterben. Die erhöhte Strahlensensitivität kann somit ein Schutzmechanismus des Organismus darstellen, der die Zellen über Apoptose oder Nekrose entfernt, um sich so vor der Gefahr einer Mutation und der Krebsentstehung (z.B. Leukämie) zu schützen. Jedoch muss die Neubildung solcher Zellen zügig erfolgen, um eine Depletion abzuf puffern und einer Immunsuppression entgegenwirken zu können. Deshalb ist es von äußerster Wichtigkeit, in zukünftigen Versuchen vor allem spezielle Blutzell-Vorläufer (Bsp. CLP, CFU-M) zu isolieren und zu phänotypisieren und deren Sensitivitäten gegen IR zu untersuchen. So können mögliche Änderungen der Sensitivitäten innerhalb der Hämatopoese auf den Einfluss der für die Differenzierung verantwortlichen Zytokine zurückgeführt werden. Dies wurde schon für Monozyten gezeigt. Monozyten sind defizient in der BER und NHEJ, da sie die Proteine XRCC1, Ligase III, DNA-PKcs und PARP-1 kaum exprimieren. Während der Ausreifung zu Makrophagen bzw. Dendritischen Zellen mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 werden die Proteine wieder exprimiert. Aufgrund dieser Unterschiede in der Reparaturkapazität sind Monozyten signifikant sensibler gegenüber ROS und TMZ im Vergleich zu Makrophagen und DCs (Bauer et al., 2011; Bauer et al., 2012; Briegert & Kaina, 2007). T-Zellen sowie CD34+ Vorläuferzellen exprimieren die o.g. Proteine, sind aber signifikant sensibler gegenüber IR als Monozyten (Abb. 3.8) (Bauer et al., 2011). Das bedeutet, dass jene Proteine in der Zelltodinduktion nach IR-vermittelten DNA-Schaden keine Rolle spielen oder ganz im Gegenteil im Fall von ATM in der Weiterleitung des Signals in Richtung Zelltod beteiligt sind (mehr dazu in Kapitel 4.4). Im direkten Vergleich zur Induktion und Reparatur IR-vermittelter DNA-Schäden konnte am LSM keine Unterschiede zwischen Monozyten und T-Zellen festgestellt werden, was nicht mit den massiven Unterschieden in der

Zelltodinduktion und Expression relevanter Proteine wie XRCC1, DNA Ligase III und PARP-1 einhergeht (Abb. 3.8). Dies lässt wiederum vermuten, dass evtl. die DNA-Schadensantwort selbst für die Einleitung des Zelltods verantwortlich ist.

Dass myeloide Zellen generell strahlenresistenter sind als lymphoide Zellen lässt einen weiteren interessanten und evolutionären Zusammenhang vermuten und die nachfolgende, sehr spekulative Betrachtungsweise zu. Das angeborene Immunsystem ist deutlich älter als das erworbene Immunsystem (Buchmann, 2014; Cooper & Alder, 2006). So zeigten schon die ersten einzelligen wie mehrzellige Organismen wie Amöben sowie Schwämme bis hin zu Insekten vor 4 – 0,7 Milliarden Jahre (Prokaryoten entstanden vor ca. 4, Eukaryoten vor ca. 2.1 Milliarden Jahren) phagozytierende Funktionen, wobei auch Granulozyten-ähnliche Zellen und Makrophagen entstanden. T- und B-Zellen entwickelten sich erst vor ca. 450 Millionen Jahren in Amphibien (Buchmann, 2014; Cooper & Alder, 2006). Dabei war die natürliche Hintergrundstrahlung, der die Organismen ausgesetzt waren, vor 0,7 – 1 Milliarde Jahren mehr als doppelt so hoch wie heute, in der früheren Zeitgeschichte sogar noch deutlich höher (Karam & Leslie, 1996). Evolutionär könnten sich also Granulozyten, Makrophagen oder generell Zellen des myeloiden oder angeborenen Systems den gegebenen Einflüssen der natürlichen Strahlung besser angepasst und Resistenzen entwickelt haben, anders als die zeitgeschichtlich jüngeren T-Zellen. Diese Eigenschaften könnten sich auch im Laufe der Evolution des Immunsystems im Menschen etabliert haben. Strahlung, wie sie im Vergleich zur natürlichen Strahlung in sehr hohen Dosen *künstlich* durch den Menschen, wie die Strahlentherapie oder nach nuklearen Unfällen wie Tschernobyl, hervorgerufen wird, schädigt somit deutlich Zellen des evolutionär jüngeren, adaptiven Immunsystems.

Das Screening zur Immuntoxizität müsste noch auf weitere Zelltypen und Subpopulationen erweitert werden, wie z.B. tumorassoziierte Makrophagen (TAMS), Th1 und Th2, NK-Zellen mit CD16 oder CD56 Phänotyp und vor allem verschiedene Vorläuferzellen der myeloiden und lymphoiden Reihe und der ganz frühen HSCs. Diese könnten am Zellsorter (FACS) gezielt aus dem Knochenmark und venösem Blut isoliert werden, sodass im Anschluss ein Screening bzgl. einer Exposition gegenüber IR durchgeführt werden kann. Auf diese Weise könnte das hämatopoetische System noch detaillierter in strahlenresistente bzw. strahlensensitive Populationen eingeteilt werden. Dadurch könnten mögliche Wiederherstellungs- oder Depletionsmechanismen von Blutzellen in IR-exponierten Personen besser abgeschätzt und berücksichtigt werden. Wäre ein solches Testsystem etabliert, könnte es auf weitere klinik- und therapierelevante Substanzen wie Artesunat, Curcumin, Cisplatin, Temozolomid etc. zur Abschätzung der Immuntoxizität als Nebenwirkung und limitierender Faktor in der Krebstherapie eingesetzt werden. Dieses „Immuntox-Testverfahren“ könnte *in vitro* für Zelltodmessungen im Labor routinemäßig durchgeführt werden, wobei parallel Tumorproben

des Patienten auf die Substanzen getestet werden. Dies könnte insbesondere in der personalisierten Krebstherapie Anwendung finden.

4.2 γ H2AX als Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur in Leukozyten

DNA ist das Hauptziel von IR, da die durch IR induzierten DNA-Schäden, insbesondere die hochtoxischen DSB das Schicksal der Zelle beeinflussen (Roos & Kaina, 2013). Die Zelle kann die IR-induzierten DSB über die NHEJ oder HR reparieren, wodurch über das Netzwerk der DNA-Schadensantwort verschiedene Zelltodmechanismen, ein Überleben, Gen-Mutationen oder Zellzyklusarrest induziert werden können (Abb. 1.4). Ein Endpunkt schließt dabei einen weiteren nicht aus. So kann eine fehlerhafte DNA-Reparatur Gen-Mutationen hervorrufen, die sich beim Überleben der Zellen manifestieren können, wodurch das Risiko der Karzinogenese erhöht ist (Deman & Van Larebeke, 2001).

Das Histon 2AX wird nach Erkennen des Schadens von verschiedenen Faktoren der DNA-Schadenserkennung phosphoryliert, wobei H2AX zu γ H2AX phosphoryliert wird und den DNA-Schaden flankiert (Fernandez-Capetillo et al., 2004). γ H2AX ist Hauptmarker für DSB, wobei eine Induktion und Abnahme des γ H2AX-Signals assoziiert ist mit der Induktion und Reparatur von DSB (Mariotti et al., 2013). Dies unterliegt jedoch enzymatischen Reaktionen, wie z.B. einer Phosphorylierung durch ATM und Dephosphorylierung von PP2A, weshalb γ H2AX noch detektierbar ist, wenn der DNA-Strang durch Reparatur wieder zusammengefügt ist (Kinner et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die DNA-Reparatureffizienz in dieser Konstellation unterschiedlicher Blutzellen der lymphoiden und myeloiden Reihe verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass trotz unterschiedlicher Strahlensensitivitäten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, CD34+ Vorläuferzellen sowie Monozyten und Makrophagen effizient DSB innerhalb von 24 h nach IR reparieren können (Abb. 3.5 - 3.7). Dies zeigte sich durch eine deutliche Induktion an γ H2AX-Foci nach 1 h und einer darauffolgenden Abnahme dieser Foci innerhalb von 24 h besonders deutlich in T-Zellen, B-Zellen, CD34+ Vorläufer und Makrophagen. Dabei zeigten *Bead*-isolierte Monozyten nach Analyse am Metafer eine verzögerte Abnahme des Signals, auch aufgrund der schon sehr hohen basalen Level an γ H2AX-Foci (Abb. 3.5). Dies könnte ein negativer Einfluss der *Bead*-Isolation wie z.B. zusätzlicher mechanischer Stress oder die magnetischen *Beads* selbst sein, die den AK binden. So zeigten Monozyten, die innerhalb der PBMCs ohne vorheriger *Bead*-Isolation spezifisch CD14-kogefärbt und am konfokalen Mikroskop ausgewertet wurden, eine deutliche Abnahme der Foci ähnlich der T-Zellen sowie sehr geringe basale Mengen an γ H2AX-Foci (Abb. 3.7 - 3.8). Bauer et al. zeigten, dass Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen eine deutlich verzögerte Abnahme an γ H2AX-Foci innerhalb von 24 h aufweisen (Bauer et al., 2011). In dieser Studie wurden die

Zellen jedoch mit einer deutlich höheren Dosis von 5 Gy bestrahlt als in dem hier dargestellten Experiment mit 2 Gy. Vermutlich sind nach höheren Dosen (5 Gy) die Reparaturkapazitäten von Monozyten erschöpft, was zu den erfassten Unterschieden im Vergleich zu Makrophagen und DCs bzgl. der γ H2AX-Foci Abnahme führt. Für CD34+ Vorläuferzellen und B-Zellen war die manuelle Auswertung von γ H2AX-Foci nach 24 h am konfokalen Mikroskop schwierig, da hier schon drastische morphologische Änderungen der Zellen zu sehen waren (Abb. 3.7). Dies geht einher mit einer deutlichen Fragmentierung von CD34+ Vorläuferzellen nach IR, was am Durchflusszytometer während der Zelltodmessungen festgestellt werden konnte (Abb. 3.2). Eine Reparatur bzw. Abnahme der γ H2AX nach 4 und 6 h ist jedoch in beiden Populationen, B-Zellen und CD34+ Vorläuferzellen, zu erkennen. Vral *et al.* konnten in T- und B-Zellen ähnliche Level in der DNA-PKcs-Aktivität und DSB-Reparatur feststellen (Vral *et al.*, 2001). B-Zellen scheinen jedoch Defizienz in der NER zu sein, wobei sie beeinträchtigt in der Aktivität von DDB2 und Ube1 sind (Hyka-Nouspikel *et al.*, 2011). Generell scheint aber für Blutzellen, insbesondere auch für die lymphoide Reihe, die IR-induzierte DSB-Reparatur zu funktionieren, aber gleichzeitig die DDR eine Art Auslöser des Zelltodes zu sein (mehr dazu in Kapitel 4.4). Dies könnte eine Art Sicherheitsmechanismus der Zelle sein, den Schaden der DNA in Form einer akuten „SOS-Antwort“ zu reparieren, jedoch über diesen Mechanismus den Zelltod einzuleiten. Dies würde, wie oben beschrieben, insbesondere in Zellen, die in der Lage sind zu proliferieren und lange zu überleben, der Gefahr einer Manifestation einer Mutation entgegenwirken.

Granulozyten (aus *Buffy Coat* isoliert sind dies hauptsächlich neutrophile Granulozyten) zeigten in diesen Versuchen keine Induktion von γ H2AX-Foci (Abb. 3.7). Dies lässt auf eine defiziente DNA-Reparatur schließen, wie sie auch in einer im Institut betreuten Masterarbeit festgestellt werden konnte (Haak, Masterarbeit 2016). So zeigten Granulozyten keine ATM oder DNA-PKcs-Expression, Faktoren, die u.a H2AX nach DNA-Schaden phosphorylieren. Unphosphoryliertes H2AX konnte in Granulozyten nachgewiesen werden. Weiterhin sind IR-induzierte DNA-Schäden mittels *Comet Assays* deutlich in Granulozyten nachweisbar (Haak, Masterarbeit 2016). Eine Reparatur dieser Schäden ist nicht zu erkennen. Aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und „Kamikazeeigenschaften“ bei Kontakt mit Pathogenen scheint ein Proteinreservoir solcher DNA-Reparaturfaktoren nicht notwendig zu sein. Auch der von Granulozyten ausgeführte Prozess der NETose, das Auswerfen von Chromatin inkl. der daran gebundenen antimikrobiellen Proteine auf Pathogene, spricht für eine solche Beobachtung einer eingeschränkte DNA-Reparatur bzw. dem Verlust wichtiger ausführender Proteine der DDR (Brinkmann *et al.*, 2004). So könnte eine funktionierende DNA-Reparatur hinderlich im Auswurf solcher Chromatinnetze sein. Auch die Daten von Salati *et al.* bestätigen eine verminderte Fähigkeit von neutrophilen Granulozyten in der Reparatur von DSB und SSB, die sie interessanterweise nicht in eosinophilen Granulozyten feststellen konnten (Salati *et al.*,

2007). Des Weiteren exprimieren eosinophile Granulozyten im Vergleich zu Neutrophilen das Protein Nucleophosmin, welches die p53-Antwort nach DNA-Schäden reguliert und Resistenz gegenüber IR vermitteln kann (Li et al., 2004). In Zukunft könnte ein Screening der DNA-Reparaturkapazität auf weitere Populationen wie Treg oder definierte und zuvor am FACS isolierte Vorläuferzellen (z.B. GMP, CLP, CFU-M) und der sehr frühen Vorläufer (HSC) aus dem Knochenmark erweitert werden. Würde sich eine solch komplexe Versuchsreihe mit phänotypisierten Zellen des Knochenmarks bzw. peripheren Bluts etablieren, könnten auch andere DNA-schädigende, klinisch relevante Substanzen getestet werden, um mögliche Wechselwirkungen oder immunsuppressive Effekte vorhersagen zu können. Zusätzlich könnten weitere DSB Marker wie 53BP1 oder pATM in das Screening aufgenommen werden. Auch eine Versuchsreihe definierter Blutzellen mittels Neutralem oder Alkalischen *Comet* Assay wären weitere Methoden in der Analyse der Reparatur von DSB oder SSB, sowie mit dem FPG-modifizierten *Comet* Assay zum Nachweis von Basenmodifikationen durch Oxidationsprozesse. Solche Daten, ermittelt über γ H2AX-Färbungen oder *Comet* Assays, geben zwar Auskunft über den Verlauf einer DNA-Reparatur, jedoch bringen sie keine Aussage, ob die Reparatur mit fehlerhaften Verknüpfungen der DNA-Stränge einhergeht. Hier müssten die Experimente auf die Untersuchung chromosomaler Translokationen/Aberrationen erweitert werden.

Im Zusammenhang mit der Detektion von γ H2AX in Blutzellen bestand die Möglichkeit über eine Kooperation mit PD Dr. med. Thomas Kindler (III. Medizinischen Klinik), Blutproben von Leukämiepatienten zu analysieren, die sich in der Phase einer Ganzkörperbestrahlung befanden. Die Ganzkörperbestrahlung wurde nach einer Chemotherapie zur Beseitigung der malignen Zellen und vor der geplanten Stammzelltransplantation durchgeführt und hatte den Zweck der kompletten Depletion der Zellen des hämatopoetischen Systems. Den Patienten wurden vor dem Start der Bestrahlungseinheiten zwei Röhrchen venöses Blut zur PBMC- und Granulozyten-Isolation im Labor zur Feststellung basaler DSB in Form von γ H2AX entnommen. Danach wurde der Patient in fraktionierten Dosen von 2 x 2 Gy pro Tag (insgesamt 3 Tage, kumulativ 12 Gy) bestrahlt (Abb. 3.9). Am darauffolgenden Tag wurde vor dem nächsten 2 x 2 Gy Behandlungszyklus erneut venöses Blut für γ H2AX-Analysen entnommen. Zwischen letzter Bestrahlungseinheit (2 Gy abends) und Isolation für die γ H2AX-Färbung lag somit jeweils ein Zeitraum von einer Nacht. Man betrachtet in diesem Zusammenhang somit nicht den Schaden direkt nach IR, sondern residuale Schäden bzw. persistierendes γ H2AX. Es konnte festgestellt werden, dass während des Zeitraums einer Ganzkörperbestrahlung CD3⁺ T-Zellen signifikant mehr γ H2AX-Foci zeigten als CD14⁺ Monozyten (Abb. 3.10). Dies geht einher mit der höheren Zelltodinduktion von T-Zellen im Vergleich zu Monozyten und der in Blutbildern ersichtlichen Lymphodepletion während einer Strahlentherapie (Abb. 1.3 und 3.8). Diese Abnahme an CD3⁺ T-Zellen konnte im Patienten

auch am FACS und LSM nachgewiesen werden, wobei T-Zellen deutlich schneller im Blut depletieren als Monozyten (Abb. 3.13 und 3.14). Monozyten zeigten, ähnlich wie von Plowman beschrieben (siehe Abb. 1.3), sogar einen kurzzeitigen Anstieg ihrer Zellzahl. Dies lässt wieder auf einen strahlenresistenten Vorläufer der Monozyten schließen, der diese trotz einer Strahlenexposition schnell nachbilden kann, oder auf eine geringe Zelltodinduktion von Monozyten und somit einen prozentualen Anstieg dieser Population innerhalb der PBMCs. Das macht die γ H2AX Analyse von Blutzellen in IR-exponierten Patienten sehr spannend, da man im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen Depletions- und Wiederherstellungsprozesse des menschlichen Organismus berücksichtigen muss. So kann es sein, dass geschädigte Monozyten in das Gewebe eindringen oder durch Makrophagen eliminiert werden. So könnten Zellen mit erhöhten DNA-Schäden zielgerichtet vom Organismus entfernt oder ausgeschieden werden. Bei einem Patienten wurde fälschlicherweise Blut direkt nach der ersten 2 Gy-Einheit anstelle der Kontrollprobe entnommen (Abb. 3.12). Hier zeigte sich ebenfalls, dass auch in einem kurzen Zeitraum nach Exposition mit IR insbesondere T-Zellen mehr γ H2AX-Foci aufweisen als Monozyten. IR-exponierte Monozyten werden entweder deutlich schneller nachgebildet als T-Zellen, deutlich schneller vom Organismus ausgeschieden oder erfahren aufgrund einer anderen Verteilung im Körper eine geringere Exposition gegenüber IR. Etwa 80 % der Lymphozyten migrieren zwischen Geweben wie Lymphknoten, Thymus, Milz und peripheren Blut mit einer Zirkulationszeit von ungefähr 12 h. Dabei wird angenommen, dass sich Lymphozyten bis zu 30 min während dieser Zirkulation im peripheren Blut befinden (Agency, 2001; Rothkamm & Horn, 2009). Das kann bedeuten, dass T-Zellen wie auch Monozyten aufgrund ihrer ungleichmäßigen Verteilung im Körper einer unterschiedlichen Exposition gegenüber IR ausgesetzt sind und zum Zeitpunkt der Blutentnahme willkürlich im peripheren Blut zirkulieren. Unklar ist auch, ob die Zunahme der γ H2AX-Foci bzw. die Unterschiede der Foci-Anzahl zwischen T-Zellen und Monozyten von Tag 0 zu Tag 3 bedingt ist durch eine höhere Akkumulation der Foci oder einer verstärkten Induktion bei mehrmaliger IR-Exposition.

Weiterhin ist die Analyse von DNA-Schäden nach dieser Behandlungsmethode an Tag 2 und 3 schwierig, da die starke Abnahme der Blutzellen ein quantitatives als auch qualitatives Analysieren erschwert. Dies ist auch an morphologischen Veränderungen der Zellen bzw. Zellkerne aufgrund der hohen, kumulativen Behandlungsdosis zu erkennen. Das äußert sich insbesondere in der Analyse von CD19+ B- und CD56+ NK-Zellen, die in viel geringeren Anteilen in PBMCs vorliegen als T-Zellen oder Monozyten (Abb. 3.15). So konnte in einem Patient ein geringer Anstieg an γ H2AX in B-Zellen bis Tag 2 festgestellt werden, aber aufgrund der Strahlung nach 3 Tagen keine B-Zellen mehr auf dem Objektträger nachgewiesen werden. Ähnliches war in einem weiteren Patienten bei der Analyse von NK-Zellen feststellbar. An Tag 0 konnten 36 CD56+ Zellen auf dem Objektträger gezählt werden, an Tag 1 waren es nur

noch vier, was eine quantitative Auswertung, wie sie bei T-Zellen und Monozyten möglich war, nicht zulässt. Für zukünftige Analysen am Patient müsste ein Auswertungssystem etabliert werden, dass ähnlich wie das Metafer-System das γ H2AX-Signal automatisch von hunderten Zellen detektiert und dabei nur Zellen mit einer CD-Markierung berücksichtigt, um den DNA-Schaden spezifischen Blutzellpopulationen zuordnen zu können. Eine Analyse von γ H2AX-positiven Zellen am Durchflusszytometer wäre eine weitere Möglichkeit der Probenverwertung. Dadurch könnten tausende Zellen in einem hohen Durchsatz gemessen werden. Für weitere Versuche müssten deutlich mehr Patienten und Blutzellpopulationen untersucht werden und die Ergebnisse im Kontext der klinischen Blutbilder gedeutet werden. Es sei hier noch erwähnt, dass in den Patienten, die einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen wurden, Granulozyten wiederum keine γ H2AX-Foci zeigten. Das ist vergleichbar mit den *in vitro* bestrahlten Granulozyten, die aus *Buffy Coats* isoliert wurden (Abb. 3.6, 3.7 und 3.11).

4.3 Die Blutropfenmethode (*Blood Drop Method, BDM*) – ein mikro-invasiver γ H2AX DNA-Schadensassay

Es stellte sich die Frage, ob es möglich ist, DNA-Schäden in Blutzellen aus nur einem Tropfen Blut analysieren und quantifizieren zu können. Dies würde viele Möglichkeiten in der Diagnostik und in der Überwachung (*Monitoring*) von Patienten eröffnen. Schon Rothkamm und Horn stellten diese Herausforderung im Ausblick ihres Reviews mit dem Titel „ γ H2AX als Protein-Biomarker für Strahlenexpositionen“ als eine noch offene Aufgabenstellung vor (Rothkamm & Horn, 2009). Sie forderten die Entwicklung einer robusten Methode zur Bestimmung von γ H2AX in Blutzellen, die für einen hohen Durchsatz zum Sammeln, Lagern und Aufbereiten der Proben geeignet ist. Das dafür benötigte Blutvolumen sollte dabei stark minimisiert sein und idealerweise aus dem Fingerkuppen entnommen werden. Diese Zukunftsvision wurde nun in dieser Arbeit umgesetzt.

Ein Tropfen peripheres Blut wurde nach einem Lanzetteneinstich aus der Fingerkuppe mit einem heparinisierten Glaskapillarröhrchen aufgenommen. Die Zellen wurden in den Röhrchen bestrahlt und in diesen für 50 min im Inkubator gelagert. Danach wurden sie auf einen unbehandelten Objektträger aufgetropft und mithilfe eines weiteren Objektträgers ausgestrichen. Nach ca. 10 min war der Blutausstrich eingetrocknet und wurde mit einem Fettstift auf ein kleines Areal eingegrenzt, um das Volumen der Antikörperlösungen gering zu halten. Für eine automatische Auswertung von γ H2AX am Metafer wurden die Ausstriche 10 min mit 4 % PFA und nach Waschen mit PBS für 10 min mit eiskaltem Ethanol fixiert. Für Analysen am konfokalen Mikroskop (LSM) zur Ko-Färbung von γ H2AX mit einem Oberflächenmarker, z.B. T-Zellen (CD3+), wurden die Ausstriche zuerst 6 min mit einem Methanol:Aceton-Gemisch (7:3), anschließend mit 2,5 % PFA fixiert. Dadurch bleiben die Oberflächenproteine im Vergleich zur Fixierung für die Metaferauswertung erhalten. Um die

BDM mit der im Labor etablierten klassischen Methode zu vergleichen, wurden parallel PBMCs aus dem *Buffy Coat* nach Ficoll-Dichtezentrifugation in Zellkulturmedium bestrahlt, nach 1 h durch Auftropfen auf ein Deckglas transferiert und nach kurzem Eintrocknen fixiert. Die Ficoll-Dichtezentrifugation führt zur Aufreinigung und Anreicherung von PBMCs aus dem leukozytenreichen Plasma (*Buffy Coat*), wobei vor allem Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten entfernt werden (Jaatinen & Laine, 2007). Die Aufreinigung von PBMCs mit Ficoll dauert 2 – 3 h bis zur Kultivierung bzw. Bestrahlung der Zellen und erfordert mehrere Zentrifugationsschritte. Weiterhin wurden Zellen von *Buffy Coat* ohne vorherige Ficoll-Dichtezentrifugation direkt mit Ammoniumchlorid versetzt und nach erfolgter Erythrolyse die Zellen für die Fixierung auf Deckgläser transferiert. In einem weiteren Ansatz wurden Zellen aus *Buffy Coat* ohne jegliche Aufreinigung und Erythrolyse direkt auf einen Objektträger ausgestrichen. Diese Methode ähnelt der BDM am ehesten und unterscheidet sich nur in der Art der „Blutquelle“. Die Ausstriche enthalten den meisten Anteil an Erythrozyten.

Mit allen Methoden, einschließlich der BDM, war es möglich, γ H2AX in Blutzellen zu färben und quantitativ (mehr als 200 Zellen pro Probe) am Metafer auszuwerten (Abb. 3.17). Dabei zeigten die Kontrollen als auch die bestrahlten Blutproben der unterschiedlichen Methoden vergleichbare γ H2AX-Signale zur BDM. Die hohe Anzahl an Erythrozyten, wie sie in den Ausstrichen von *Buffy Coat* bzw. der BDM vorliegt, störten die Färbung sowie die Auswertung nicht. Die Erythrozyten sind im Mikroskop als schwarzer Hintergrund zu erkennen, da sie keine DNA (keinen Zellkern) besitzen und so nicht mit DAPI bzw. TO-PRO-3 angefärbt werden können. Lediglich das Auswerten bzw. Auszählen der Zellen in den Blutausstrichen ist zeitintensiver, da hier die Lymphozyten auf den Arealen des Deckglases weit verteilt vorliegen und das Deckglas länger gescannt werden muss, um eine größere Anzahl an Zellen auswerten zu können. Das gescannte Bild von Proben der BDM ist aufgrund der vielen Erythrozyten deutlich schwarzer als in den Lymphozyten-dichten, aufgereinigten PBMCs nach Ficoll. Weiterhin ist es mit der BDM möglich, spezifische Oberflächenmarker der Lymphozyten mit γ H2AX am LSM ko-zufärben, was wiederum die Analyse von DNA-Schäden in spezifisch Blutzellpopulationen wie CD3⁺ T-Zellen oder CD14⁺ Monozyten erlaubt (Abb. 3.18). Insbesondere Granulozyten, die keine γ H2AX-Foci bilden, können dabei ausgeschlossen werden, auch wenn sich diese z.T. schon morphologisch aufgrund der eingeschnürten Zellkerne unterscheiden lassen. Die BDM könnte noch auf CD19⁺ B- und CD56⁺ NK-Zellen Analysen erweitert werden, wenngleich hinsichtlich der bereits sehr geringen Anteile in vorgereinigten PBMCs eine quantitative Auswertung sich als schwierig gestalten kann.

Peripheres Blut aus der Fingerspitze kann mehrere Stunden bis mindestens einem Tag ohne zu Koagulieren oder Auszutrocknen innerhalb der heparinisierten Glaskapillaren im Inkubator gelagert werden. Dies ermöglicht Studien von DNA-Reparaturkinetiken. So wurde ein Tropfen Blut auf mehrere heparinisierte Röhrchen verteilt, bestrahlt und nach unterschiedlichen

Zeitpunkten ausgestrichen. 1 h nach Bestrahlung konnte eine signifikante Induktion an γ H2AX in T-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.20 A). Das Signal von γ H2AX nahm danach bis 8 h nach der Exposition mit IR auf Kontrollniveau ab. Diese Abnahme von γ H2AX ist assoziiert mit der Reparatur von DSB. Die Reparaturkinetiken der BDM sind vergleichbar mit γ H2AX Analysen aus anderen hier durchgeführten Studien (Abb. 3.20 B) bzw. mit der Literatur (Redon et al., 2009). So nehmen die γ H2AX-Signale nach 3 – 6 h in T-Zellen um 50 % ab. Die BDM ermöglicht somit einen Nachweis individueller DNA-Reparaturkapazitäten von Patienten und könnte somit Hinweise geben, wie und in welcher Weise das Immunsystem des Patienten auf strahlentherapeutische Interventionen reagiert. Es wäre erstrebenswert zu testen, ob auch andere Behandlungsmöglichkeiten anstelle einer Exposition mit IR innerhalb der Glaskapillarröhrchen möglich wären. So könnten Blutzellen aus der Fingerspitze durch direkte Zugabe von DNA-schädigenden Substanzen in die Glaskapillare und anschließender Lagerung im Inkubator (zur Entfaltung des toxischen Potentials) nach γ H2AX-Signalen analysiert werden.

Die BDM erlaubt weiterhin das Anfärben weiterer Proteine der DDR wie pATM, das ATM-Substrat pKAP1 und 53BP1 sowie prozessierte SSB anhand von RPA nachzuweisen (Abb. 3.22).

Ein wichtiger Punkt ist die Lagerungsfähigkeit der Blutausstriche. Es konnte gezeigt werden, dass bestrahlte Proben, die 1 h nach IR-Exposition eingetrocknet wurden, bis zu 7 Tage bei RT gelagert werden können und weiterhin für CD3 und γ H2AX anfärbbar sind (Abb. 3.19 B). Blutausstriche, die direkt nach Eintrocknen gegen CD3/ γ H2AX angefärbt wurden (Tag 0), wiesen ähnliche γ H2AX-Signale auf wie Proben, die 7 Tage bei Rt im Dunkeln gelagert wurden (Tag 7). Dies macht deutlich, dass das Eintrocknen des Blutes auf dem Objektträger die Zellen auch metabolisch inaktiviert bzw. „einfriert“ und die IR-induzierte Phosphorylierung von H2AX als auch der CD3 T-Zellrezeptor bis zu 7 Tagen strukturell erhalten bleiben. Das bei Tag 7 beobachtete höhere mittlere γ H2AX-Signal im Vergleich zu Tag 0 könnte vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass den Zellen für Tag 7 bei Trocknung ohne direkte Fixierung mehr Zeit bleibt, γ H2AX auszubilden (sie somit metabolisch etwas länger aktiv sind) als Zellen, die nach Trocknung direkt fixiert und eingedeckt werden. 4 Wochen gelagerte Blutausstriche konnten nicht mehr für γ H2AX angefärbt werden, da innerhalb dieser Zeitspanne die Zellstrukturen degradieren (Abb. 3.19 A). Zur Vollständigkeit sei hier erwähnt, dass fixierte und im Anschluss getrocknete Ausstriche nach 7 Tagen Lagerung nicht mehr für CD3 und γ H2AX angefärbt werden konnten. Vermutlich degradieren fixierte Ausstriche nach Trocknung ohne direkte Fortführung des Protokolls bis zum Eindecken mit Vectashield. Es wird somit empfohlen, nicht vorfixierte Ausstriche sondern nur getrocknete oder bereits in Vectashield eingedeckte Ausstriche zu lagern. Die Lagerungseigenschaft der Ausstriche ist speziell für Feldstudien bzw. epidemiologische Studien von essentieller Bedeutung. Blutausstriche

können an einem beliebigen Ort X generiert und erst später an ein Zentrallabor innerhalb von 7 Tagen ausgeliefert und ausgewertet werden.

Zudem kann die BDM auch bei Mäusen angewendet werden (Abb. 3.21). Die Schwanzvene wurde mit einem Skalpell angeritzt, das austretende Blut mit heparinisierten Glaskapillaren aufgenommen und gemäß BDM Protokoll verarbeitet. Idealerweise muss dabei die Zusammenstellung der für die BDM verwendeten AK, CD3 (aus Ratte) und γ H2AX (aus Kaninchen), nicht geändert werden. Die Mäuse überleben den Eingriff, wodurch im Laufe einer Versuchsreihe das Blut auf DNA-Schäden getestet werden kann, ohne die Mäuse töten bzw. das Experiment abbrechen zu müssen. Es konnten auch DNA-Schäden in Blutzellen von Mäusen, die einer gentoxischen Behandlung (hier TMZ) ausgesetzt waren, untersucht werden (Abb. 3.21 B).

Zusammengefasst ist die mikro-invasive BDM einfach, kostengünstig, schnell und benötigt wenig Probenmaterial sowie kaum Laborausstattung im Vergleich zur Ficoll-Methode. Proben der BDM können mehrere Tage gelagert werden, was eine sofortige Prozessierung der Ausstriche nicht erfordert und so eine zeitliche Flexibilität gegeben ist. Sie kann auf spezifische Blutzellpopulationen verifiziert werden und ermöglicht das Detektieren weiterer Proteine der DDR bzw. Proteine, die als mögliche Biomarker einer Erkrankung oder einer therapeutischen Intervention dienen können. Da γ H2AX-Foci in Blutzellen auf nicht-reparierte DSB in Vorläuferzellen oder persistierende DNA-Schäden langlebiger Zellen hinweisen, könnten Patienten ihre basalen DNA-Schäden mithilfe der BDM ermitteln. Auch die schnelle Erstellung individueller Reparaturkinetiken ist vorstellbar. Die BDM kann in groß angelegten Feldstudien in humanen Populationen aber auch in Mausexperimenten Verwendung finden. So könnte mit der BDM ermittelt werden, ob *Lifestyle*-Faktoren (Alkohol, Rauchen, Nahrungsergänzungsmittel, Karzinogene in Nahrung) oder endogener Stress wie Entzündungen, emotionaler Stress (Burnout, PTSD) und Extremsport (Bsp. Marathonlauf) DNA-Schäden im Blut induzieren. Die BDM kann in Bereichen der Riodosimetrie eingesetzt werden, wie z.B. in Raumfahrtmissionen (NASA, ESA), in Risikogebieten wie Fukushima oder Tschernobyl (insbesondere für Aufräumarbeiter) oder in klinischen Applikationen wie der Strahlentherapie. Dabei ist es möglich, die Dosis einer Strahlenexposition an den DNA-Schäden im Blut „ablesen“ zu können (Redon et al., 2009; Zahnreich et al., 2015).

Generell kann die BDM auch in Krebspatienten Anwendung finden, die mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika behandelt werden. Diese kostengünstige und einfache Methode würde vor allem in der sehr teuren personalisierten Krebstherapie an Bedeutung gewinnen. Anhand der DNA-Schäden im Blut könnten Dosen der Medikamente individuell angepasst werden. Niedrige DNA-Schäden im Blut könnten dabei für eine geringe, bevorstehende Immunsuppression als Nebenwirkung interpretiert werden und eine Erhöhung der Dosen in der Krebsmedikation befürworten und umgekehrt. Die für den Patienten höchstmöglich

erträgliche Dosis könnte somit ermittelt werden, wobei höhere Dosen in der Therapie einen aggressiveren antitumoralen Effekt auslösen und dies zu einem gesteigerten Überleben des Patienten führen kann. Eine Anwendung der mikro-invasiven BDM im Bereich der Pädiatrie ist auch vorstellbar, insbesondere mit dem Hintergrund der Angst von Kindern vor Blutentnahmen und Spritzen (Nadelphobie).

Eine zukünftige Herausforderung der BDM ist ihre Standardisierung. Jede γ H2AX-Färbung ist von Labor zu Labor unterschiedlich, besonders hinsichtlich der heterogenen Populationen im Blut. Wichtig wären interne Kontrollen (z.B. γ H2AX *Beads* zur Validierung bzw. Abgleich des Signals), laboreinheitliche automatische Auswertverfahren (Software und Scann-Programme) sowie die Verwendung hochauflösender Mikroskope (Ivashkevich et al., 2012; Muslimovic et al., 2012). Denn γ H2AX-Foci können auch als sog. *Cluster* auftreten und miteinander „verschmelzen“. Eine niedrige Auflösung des Mikroskops führt somit zu einer geringeren Anzahl an γ H2AX-Foci. Es ist auch zu beachten, dass in vielen Scann-Prozessen γ H2AX-Foci ober oder unterhalb der aufgenommenen Ebene nicht analysiert werden. Zusätzlich könnte ein Programm entwickelt werden, das während des Scann-Prozesses am Mikroskop nur Zellen mit Oberflächenmarker erkennt und in diesen γ H2AX-Foci auswertet. γ H2AX wird oft nicht als Endpunktmarker anerkannt, sondern als Faktor, der einen Prozess (Ablauf einer Reparatur) beschreibt. Evtl. ist es sogar möglich, die BDM mit einem *Comet Assay* zu kombinieren, d.h. ein Tropfen Blut mit Agarose zu mischen, dann auf einen Objektträger auszustreichen und im Anschluss die Zellen nach dem *Comet Assay* Protokoll aufzuarbeiten. Auf diese Art könnten SSB und DSB in Zellen aus einem Tropfen Blut anhand eines modifizierten *Comet Assays* direkt analysiert werden. Interessant wäre im Kontext der BDM auch eine Kombination von Oberflächenmarkern mit Zelltodmarkern oder sogar Tumormarkern. Dass sich eine solche Methode ähnlich der BDM erfolgreich vermarkten lässt, zeigt das *Start-Up* Unternehmen *Exogen Biotechnology* aus Kalifornien. Die Firma entwickelt Kits zur Bestimmung von DNA-Schäden und der DNA-Reparaturkapazität von Zellen aus geringen Mengen Blut und betrachtet sich als klinisches Servicelabor zur Auswertung von Patientenproben, aber auch von Blutproben von Privatpersonen, die ihren DNA-Schaden aus Eigeninteresse bestimmen lassen wollen (*Exogen Biotechnology*).

4.4 Unstimulierte Lymphozyten sind strahlensensitiv und eine Stimulation des T-Zellrezeptors mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 führt zur Strahlenresistenz

Unstimulierte T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut befinden sich in der G0/G1-Phase und sind von den hier untersuchten Blutzelltypen die deutlich strahlensensitivsten Zellen (Abb. 3.1 und 3.25). Eine Dosis von nur 0,125 und 0,25 Gy führte schon in 30 % der Zellen nach nur 24 h zum Zelltod. Werden Lymphozyten mit Antikörpern gegen den T-Zellrezeptor CD3 und Ko-

Rezeptor CD28 aktiviert, so führt dies zu einem signifikanten Schutz gegenüber IR (Abb. 3.25 bis 3.28). Dies konnte auch in isolierten bzw. am Durchflusszytometer definierte CTL, Th und Treg festgestellt werden. Carloni *et al.* konnte dieses Phänomen bereits in PHA (Phytohämagglutinin) stimulierten Lymphozyten beobachten (Carloni *et al.*, 2001). Dabei aktiviert PHA neben den T-Zellrezeptoren u.a. auch Toll-like Rezeptoren (da Silva & Correia, 2014). Eine Stimulation der Lymphozyten stellt eine Situation dar, wie sie auch in Entzündungen, Immuntherapien bzw. in Immunantworten generell vorherrscht. Die Aktivierung der Lymphozyten geht einher mit deutlich morphologischen Veränderungen der Zellen. Sie werden größer und bilden in der Zellkultur kleine Inseln (Abb. 3.23).

Ein weiteres Merkmal ist der Anstieg von S- und G2-Phase Zellen, was bedeutet, dass diese Zellen sich teilen bzw. proliferieren (Abb. 3.24). Vergleicht man folglich unstimulierte mit stimulierten Lymphozyten, vergleicht man demnach nicht-proliferierende mit proliferierenden Zellen. Die Strahlenprotektion in stimulierten Zellen ist daher ungewöhnlich, da vor allem schnell proliferierende Zellen wie Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen bzw. IR deutlich höhere Sensitivitäten zeigen als sich langsam-teilende oder nicht-proliferierende Zellen (Mitchison, 2012). DNA-Schäden können demnach in einer sich teilenden Zelle aufgrund von Replikationsblock, dem Zusammenbruch der Replikationsgabel oder einer mitotischen Katastrophe zum Zelltod führen (Ghosal & Chen, 2013; Huang *et al.*, 2005). Es stellt sich die Frage, warum eine Stimulation der Lymphozyten vor IR-induzierten Schäden schützt und warum unstimulierte Lymphozyten derart strahlensensitiv sind. Diese Frage konnte nur spekulativ beantwortet werden. Dieses Phänomen der Strahlenprotektion nach einer Aktivierung bzw. Induktion der Proliferation konnte in CD34+ Vorläuferzellen (CD34 expand versus nicht-expand) nicht festgestellt werden (3.25 B). CD34+ Vorläuferzellen, die mittels Zytokin-Cocktail expandiert/stimuliert wurden, zeigten keine Protektion gegenüber IR im Vergleich zu CD34+ Zellen, die nicht in diesem Cocktail kultiviert wurden. Der Effekt des Schutzes gegenüber IR nach Zellaktivierung scheint also speziell auf T-Zellen bzw. den T-Zellrezeptor zuzutreffen. Unstimulierte T-Zellen zeigten deutlich früh (12 h) einen Anstieg an apoptotischen Signalen, kaum Nekrose (Abb. 3.27). Dabei ist in SubG1-Messungen auch eine erhöhte Fragmentierung der DNA im Vergleich zu stimulierten Lymphozyten zu erkennen (Abb. 3.28).

Erste Überlegungen, ob Unterschiede in der Effizienz der Reparatur von SSB und DSB vorliegen, konnte mittels *Comet Assays* ausgeschlossen werden (Abb. 3.29 und 3.30). So zeigten unstimulierte wie auch stimulierte Lymphozyten eine profiziente Reparatur von SSB und DSB. Im Falle der Lymphozyten wäre eine Reparaturdefizienz von DSB besonders kontraproduktiv, da sie insbesondere die NHEJ bereits in ihrer Entwicklung bzw. VDJ-Rekombination benötigen, um u.a. vielfältige Varianten des T-Zellrezeptors herzustellen (Engels *et al.*, 2007). Jedoch hätte man in proliferierenden Lymphozyten eine effektivere DSB-

Reparatur aufgrund der HR erwartet, die nur in replizierenden Zellen aktiv sein kann, wenn ein DNA-Sequenzhomolog vorliegt (Iyama & Wilson, 2013). Auch in der Phosphorylierung von p53 an Ser45 oder Ser15 konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.31). Stimulierte T-Zellen zeigten auch basal eine höhere p53-Expression, wie auch höhere basale Level des FasR (Abb. 3.32). p53 ist auch Transkriptionsfaktor für den FasR (Waring & Mullbacher, 1999). Jedoch geht hier die erhöhte FasR-Expression in stimulierten Lymphozyten nicht mit einer erhöhten Zelltodinduktion einher. HIPK2 phosphoryliert u.a. p53, konnte aber in beiden Populationen nicht detektiert werden (Abb. 3.31). Dies müsste mit einem anderen AK nochmals verifiziert werden. Interessanterweise konnte in unstimulierten Lymphozyten keine Aktivierung der Caspasen-3, -7, -8 und -9 festgestellt werden, wohl aber in stimulierten Lymphozyten (Abb. 3.33 und 3.34). Stimulierte Lymphozyten zeigten auch in der unbehandelten Kontrolle eine erhöhte Caspaseaktivität. Zugleich konnte eine PARP-1 Spaltung, ein Merkmal der Caspaseaktivität, nur in der stimulierten Population detektiert werden (Abb. 3.33). Auch ein genereller Inhibitor der Caspasen zeigte keine Effekte auf den IR-induzierten Zelltod in beiden (den unstimulierten und den stimulierten) Populationen (Abb. 3.35 A). Alam et al. zeigten in einer Publikation ebenfalls erhöhte Caspaseaktivitäten in aktivierten, nicht-apoptotischen Lymphozyten und definierten eine Caspaseaktivität als physiologische Notwendigkeit aktivierter Lymphozyten (Alam et al., 1999). Weiterhin sind Caspasen auch für die Prozessierung von Zytokinen verantwortlich, die nach Sekretion eine Immunreaktion auslösen können (McIlwain et al., 2013). Man könnte spekulativ schlussfolgern: Würden Lymphozyten über eine Caspaseaktivität sterben, könnte dabei jeweils eine Immunreaktion ausgelöst werden, da eine Aktivierung von Zytokinen verursacht wird. Die Konsequenzen wären unkontrollierte Entzündungsreaktionen bzw. Autoimmunerkrankungen.

Da PARP-1 in stimulierten Zellen bereits in der Kontrolle gespalten vorlag, wurde der PARP-1-induzierte Zelltodweg (Parthanatos) untersucht. Auch hier konnte weder ein PARP-1-Inhibitor (Olaparib) einen Effekt auf den Zelltod in beiden Populationen ausüben, noch konnte in immunhistochemischen Untersuchungen eine AIF-Translokation in den Zellkern festgestellt werden (Abb. 3.38). Stimulierte Zellen zeigten jedoch deutlich stärkere AIF Signale außerhalb des Kerns, was auf metabolische, morphologische Veränderungen der Mitochondrien, der Speicherort von AIF, zurückgeführt werden könnte. In zukünftigen Versuchen sollte zusätzlich AIF in Western Blot-Kernextrakten untersucht werden. Eine PARP-1-Aktivität konnte nach IR in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten in vorläufigen Experimenten mit einer PAR-Färbung festgestellt werden (im Anhang Abb. 6.12). Ob sich beide Populationen in der zeitlichen Abnahme des PAR-Signals bzw. der Aktivitätsdauer von PARP-1 nach IR unterscheiden, müsste in weiteren Versuchen verifiziert werden.

Mittels CytolD® Färbung wurde der Prozess der Autophagie untersucht (im Anhang Abb. 6.13). Stimulierte Zellen zeigten signifikant höhere Autophagiesignale als unstimulierte, nach IR konnte sogar in beiden Populationen ein leichter Anstieg autophagischer Zellen detektiert werden. Man könnte somit Autophagie als möglichen Schutzmechanismus in stimulierten Zellen deuten. Die erhöhte Autophagie müsste jedoch in weiteren Experimenten, wie Untersuchungen der LC3- oder p62-Expression, bestätigt werden. Vollständigkeitshalber wurde Seneszenz mittels β -Galaktosidase-Färbung am Durchflusszytometer gemessen (im Anhang Abb. 6.14). Stimulierte Zellen zeigten nach IR keine Induktion an seneszenten Zellen, unstimulierte Zellen einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg. Dies ist schwierig zu deuten, da sich unstimulierte ähnlich wie seneszente Zellen schon in der G0/G1-Phase befinden und somit dem Zustand der Seneszenz sehr ähneln. Eine Induktion von Seneszenz in stimulierten Zellen hätte mögliche Hinweise für einen Schutz vor IR geliefert, indem stimulierte Zellen den Zustand der Seneszenz anstelle der Apoptose eingeleitet hätten. Dies konnte hier aber nicht gezeigt werden.

Ein Experiment mit CHK1- und CHK2-Inhibitoren lieferte unerwartete Ergebnisse. Unstimulierte T-Zellen konnten signifikant mit Inhibitoren gegen CHK1/2 gegenüber IR geschützt werden, wobei der Effekt einer CHK2-Inhibition deutlicher ausgeprägt war (Abb. 3.42). Die Hemmung hatte keinen Einfluss auf stimulierte Zellen. CHK1 und 2 werden u.a. von ATM phosphoryliert (Bartek & Lukas, 2003). Die Inhibition von ATM schützte unstimulierte Zellen vollständig gegenüber IR-induzierten Zelltod (Abb. 3.40 und 3.41). Dieser Effekt war unerwartet, denn ATM-Inhibitoren werden als sog. *Radiosensitizer* im Bereich der Tumorthherapie bezeichnet (Khalil et al., 2012). Des Weiteren sind A-T-Patienten, die ATM-Mutationen und stark eingeschränkte ATM-Kinaseaktivitäten aufweisen, hypersensitiv gegenüber IR, besonders ausgeprägt in Fibroblasten (Foray et al., 1997, Perlman et al., 2003). ATM scheint jedoch in Lymphozyten den Zelltod nach IR-vermittelten DNA-Schaden zu induzieren. Eine Hemmung von ATR und p53 hatte keinen Einfluss auf die IR-induzierte Zelltodinduktion in unstimulierten als auch stimulierten Lymphozyten (Abb. 3.40). Der Einfluss von p53 auf die Strahlensensitivität ist vor allem in Leukämiezellen kontrovers. So zeigen p53 wt Leukämiezellen (entartete T-Zellen bzw. pre-myeloide Zellen) eine höhere Strahlensensitivität als p53 mutierte oder deletierte Zellen (Aldridge & Radford, 1998; Heylmann et al., 2014). Gleichzeitig sind jedoch entartete B-Zellen des Mantelzell-Lymphoms trotz einer Defizienz in der p53 Funktion sehr strahlensensitiv. Dies wurde z.T. auch in einer ATM-Mutation in diesem Zelltyp begründet (M'Kacher et al., 2003). Auch der RIPK1-Inhibitor Nekrostatin, der Nekroptose inhibieren kann, zeigte keine Wirkung auf unstimulierte und stimulierte Lymphozyten auf den IR-vermittelten Zelltod, was die Nekroptose in unstimulierten Lymphozyten ausschließt (Abb. 3.40).

Wie vermittelt nun ATM den Zelltod in Lymphozyten? Da ATM u.a auch Caspase-2 aktivieren kann (Ando et al., 2012) und die Signale einer gespaltenen Caspase-2 im WB für unstimulierte Zellen nicht eindeutig waren (Abb. 3.33), wurden die Zellen mit einem Caspase-2-Inhibitor vorbehandelt. Der zuvor verwendete Pan-Caspase-Inhibitor zeigte zwar keine Wirkung, ist vermutlich aber nicht spezifisch für die Hemmung der Caspase-2. Auch mit der Vorbehandlung eines Caspase-2 Inhibitors konnte kein deutlicher Schutz der Zellen gegenüber IR nachgewiesen werden (Abb. 3.36). Darüber hinaus wird ATM auch mit der Induktion der Pyroptose bzw. Aktivierung des Inflammasoms in Verbindung gebracht (Erttmann et al., 2016). Um den pyroptotischen Zelltod von Lymphozyten nach IR ausschließen zu können, wurde die Caspase-1 Spaltung und die Spaltung deren Substrates Gasdermin D näher betrachtet. In unstimulierten wie auch stimulierten Lymphozyten konnte keine Spaltung der Caspase-1 und deren Substrat Gasdermin D festgestellt werden (Abb. 3.37 A). Um Pyroptose ausschließen zu können, wurde die Zellen vor IR mit einem spezifischen Caspase-1-Inhibitor behandelt. Auch hier hatte die Hemmung der Caspase-1 keinen Einfluss auf den IR-vermittelten Zelltod in Lymphozyten (Abb. 3.37 B). Der ATM-induzierte Zelltod in Lymphozyten scheint also komplexer zu sein als erwartet.

Weitere Möglichkeiten eines ATM vermittelten Zelltodes könnte das Protein c-ABL sein, welches über p73 den Zelltod auslösen kann (Christmann et al., 2003). p73 Western Blots (nicht in dieser Arbeit gezeigt) zeigten viele unspezifische Banden und konnten nicht ausgewertet werden. Dies müsste mit einem deutlich spezifischeren AK wiederholt werden. Auch der Proteinkinase-Inhibitor Dasatinib, der u.a. in der Behandlung von Leukämien eingesetzt wird, und auch c-ABL hemmt, zeigte in den Blutzellen keinen Effekt auf den IR-induzierten Zelltod (Abb. 3.44) (Vandyke et al., 2011). Interessant ist weiterhin, dass auch eine Inhibition des MRN-Komplexes (MRE11 durch Mirin) einen Schutz gegenüber IR in den Zellen vermittelte (Abb. 3.43 A). Der MRN-Komplex wird für die Aktivierung von ATM benötigt und ist wesentlich an der Erkennung und Prozessierung von DNA-Schäden beteiligt (Uziel et al., 2003).

Die Inhibition von DNA-PK, ein weiterer wichtiger Sensor von DNA-Schäden, schützt die Lymphozyten nicht vor IR-induziertem Zelltod. So führt die Hemmung in unstimulierten wie auch stimulierten Lymphozyten zu einer Sensitivierung gegenüber IR (Abb. 3.34 B). DNA-PK übernimmt vermutlich eine wichtige Rolle im Schutz vor IR-vermittelten Zelltod in Lymphozyten, insbesondere der stimulierten Population. Eine Hemmung von DNA-PK führt zur Inhibition der NHEJ, wobei man mehr DSB in G1-Phase Zellen erwarten würde, wenn keine HR aktiv ist. Diese DSB könnten ATM vermittelt zu mehr Zelltod führen. In weiteren Experimenten müssten *Comet Assays* oder γ H2AX-Färbungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob mehr DNA-Schäden nach DNA-PK-Inhibition und anschließender IR-Exposition auftreten. Auch eine Kombination DNA-PK-Inhibitor mit ATM- oder MRN-Inhibitor

wäre denkbar, um zu untersuchen, welche Proteine für die Reparatur des DNA-Schadens in Lymphozyten essentiell sind. Auch hinsichtlich Zelltodinduktion wäre eine Kombination ATM-mit DNA-PK-Inhibitor interessant. So könnte ermittelt werden, ob der erhöhte Zelltod nach DNA-PK-Inhibition durch eine ATM-Hemmung abgeschwächt werden kann.

ATR scheint keine Auswirkungen in der Strahlensensitivität von Lymphozyten zu besitzen, da der ATR-Inhibitor keinen Einfluss auf den strahleninduzierten Zelltod zeigte (Abb. 3.40). Vergleicht man das Genexpressionsmuster unstimulierter und CD3/CD28 stimulierter Lymphozyten mittels Real-Time RT PCR, so ist zu erkennen, dass *ATM* eines der wenigen Gene ist, die in der stimulierten Population herabreguliert sind. Diese *ATM*-Herabregulation zeigte sich auch in einer älteren Publikation, die PHA stimulierte versus nicht-stimulierte Lymphozyten verglich (Mayer et al., 2002). Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass in stimulierten Zellen nach IR deutlich weniger pATM Signale auftreten, als in unstimulierten Zellen (Abb. 3.45). Dies geht einher mit dem beobachteten Effekt des ATM-getriggerten Zelltods. Nach IR scheint mehr zelltodinduzierendes ATM in unstimulierten als stimulierten Lymphozyten aktiviert zu werden, was die erhöhte Strahlenresistenz in stimulierten Zellen erklären könnte. Proteinuntersuchungen von ATM und pATM mittels Western Blot stehen noch aus.

Im Genexpressionsprofil konnte eine deutliche Hochregulation von *Survivin* in stimulierten Lymphozyten festgestellt werden. Survivin schützt u.a. Tumorzellen vor Zelltod, indem es die Aktivität von Caspasen inhibiert (Altieri, 2003). Survivin könnte so in stimulierten Zellen vor deren übermäßige Caspaseaktivität regulatorische bzw. schützende Funktion besitzen. Ob nun Survivin für den Schutz gegenüber IR in stimulierten Lymphozyten verantwortlich ist, konnte in Versuchen mit einem spezifischen Survivin-Inhibitor nicht bestätigt werden (Abb. 3.48). Weiterhin konnte eine transkriptionelle Hochregulation von *MTH1* gemessen werden. MTH1 schützt Zellen vor oxidativen Stress, indem es verhindert, dass oxidierte Nukleotide in die DNA eingebaut werden (Furuichi et al., 1994; Sakumi et al., 1993). Da das ROS Level vermutlich aufgrund des erhöhten Metabolismus und der Proliferation von stimulierten Zellen signifikant höher ist als in unstimulierten Zellen, sind die erhöhten MTH1 Werte auf Transkriptionsebene nachvollziehbar. Die Expression von *MTH1* müsste weiterhin auf Proteinebene ermittelt werden. Um zu überprüfen, ob MTH1 in stimulierten Zellen einen Schutz gegen IR bewirkt, wurden unstimulierte und stimulierte Lymphozyten mit einem MTH1-Inhibitor (TH 588) vorbehandelt. Dieser zeigte jedoch keinen Effekt auf den IR-vermittelten Zelltod in beiden Populationen (Abb. 3.51 A). Stimulierte Lymphozyten zeigten jedoch eine signifikant höhere Toxizität gegenüber TH 588 als unstimulierte Zellen (Abb. 3.51 B). Das deutet darauf hin, dass stimulierte Lymphozyten MTH1 benötigen, um die basal hohen ROS Level kompensieren zu können. Auf diese Weise wäre die MTH1-Inhibition z.B. durch vermehrten Einbau von 8-Oxo-Guanin in die replizierende DNA in stimulierten und somit

proliferierenden Lymphozyten toxisch. Auch Tumorzellen besitzen aufgrund ihrer erhöhten metabolischen Aktivität, der erhöhten Teilungsrate und dysfunktionaler ROS-Regulation erhöhte Mengen an ROS und erhöhte Proteinlevel an MTH1. Dies ist der Grund, weshalb MTH1-Inhibitoren eingesetzt werden, um gezielt Tumorzellen zu töten und deren Replikation zu hemmen (Gad et al., 2014; Svensson et al., 2011). Der MTH1-Inhibitor TH588 zeigte jedoch auch Toxizität in aktivierten Lymphozyten. Somit wäre eine Kombination von MTH1-Inhibitoren mit immuntherapeutischen Strategien zur Aktivierung der T-Zellen kontraindiziert.

Auf Genebene konnte weiterhin eine Hochregulation der Reparaturfaktoren *BRCA1*, *FEN1*, *KU70*, *PARP*, *MGMT*, *DNA-PKcs* und *POLQ* ermittelt werden. In der DNA-Reparatur von unstimulierten versus stimulierten Populationen konnten zwar keine Unterschiede festgestellt werden, wahrscheinlich benötigen aber stimulierte Zellen aufgrund ihrer Proliferationseigenschaften eine höhere Kapazität an DNA-Reparaturfaktoren. Dies müsste speziell für diese Gene zusätzlich auf Proteinebene überprüft werden. Zusätzlich könnte auch die Hochregulation von *BCL-2*, ein antiapoptotischer Faktor des mitochondrialen Zelltodweges, in der Strahlenresistenz von aktivierten Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen, obwohl eine Verbindung zur Caspase-9 aufgrund der o.g. Versuche ausgeschlossen werden kann. Zusammengefasst hebt sich ATM als Zelltodvermittler in Lymphozyten nach IR-induziertem DNA-Schaden am deutlichsten hervor. ATM Mutationen werden vor allem in Leukämiezellen beschrieben (Gumy-Pause et al., 2004). Leukämiezellen zeigen oft Veränderungen in der ATM-Genexpression, wobei diese auch schon in der Entstehung dieser Erkrankungen Einfluss haben könnte. AT-Patienten weisen dysfunktionales ATM auf und haben u.a. ein erhöhtes Risiko an Leukämien zu erkranken (Taylor et al. 1996). Im Kontext eines ATM-vermittelten Zelltods in Lymphozyten erscheint dies nachvollziehbar. So könnte ATM als eine Art Schutzfaktor der Entstehung von Leukämien entgegenwirken, da es nach DNA-Schäden und der damit verbundenen Gefahr einer Manifestation von Mutationen den Zelltod in Lymphozyten einleitet. Das würde eine Karzinogenese verhindern, indem die Zelle durch Einleiten des Zelltods aus dem Organismus entfernt wird. In A-T-Patienten wäre dieser Schutzmechanismus ausgeschaltet. Entwickeln also Zellen während der Hämatopoese eine ATM-Mutation, so könnte das Risiko der Entstehung einer leukämischen Zelle nach DNA-Schaden begünstigt werden. Die erhöhte Sensitivität von A-T-Patienten gegenüber Strahlung aufgrund der ATM-Mutation hingegen ist zellspezifisch. ATM-defiziente Fibroblasten der Patienten weisen eine hohe Strahlensensitivität, Neuronen aber eine Strahlenresistenz auf (Foray et al., 1997, Eric et al., 1999). ATM hat somit eine zellspezifische, duale Rolle in der Strahlensensitivität.

Die hier gezeigten Daten und die Studien an A-T-Patienten zeigen, dass ATM der Schlüssel in der Pathogenese von Leukämien sein kann. Des Weiteren sind Leukämiezellen auch eine Art „stimulierter“, unkontrolliert wachsender Lymphozyt und im weitesten Sinne vergleichbar

mit einem aktivierten Lymphozyten während einer Immunreaktion. Die hier untersuchten Ergebnisse an stimulierten Lymphozyten könnten evtl. auf Leukämiezellen übertragen werden. Hierfür müsste in Zukunft eine Leukämiezelllinie wie TK6 oder Jurkat in den Versuchen als Vergleich mitgeführt werden, um einen Bezug von ATM-Aktivierung und IR-induziertem Zelltod in Leukämiezellen herstellen zu können. Vorausgesetzt Leukämiezellen sind defizient in ihrer ATM-Funktion, so könnte hypothetisch eine Reaktivierung von ATM in den Zellen die Strahlensensitivität erhöhen und den Erfolg einer Therapie deutlich verbessern. Dabei wäre es sinnvoll, den ATM-Status und -Aktivität in Zellen von Leukämiepatienten zu ermitteln. Weiterhin könnte überprüft werden, ob eine ATM-Inhibition in anderen Blutpopulationen wie den strahlenresistenten Monozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen ähnliche Effekte oder womöglich eine Sensibilisierung gegenüber IR induziert. Andererseits könnte untersucht werden, ob eine ATM-Inhibition auch B-, NK-Zellen oder CD34+ Vorläuferzellen vor IR schützt oder ob diese Wirkung nur in T-Zellen auftritt.

Ein weiterer Anhaltspunkt bzgl. einer vermittelten Strahlenresistenz könnte die Aktivierung des CD25 (IL-2Ra)-Rezeptors sein (Malek & Castro, 2010). Dieser wird in stimulierten Lymphozyten im Gegensatz zu nicht-stimulierten Zellen exprimiert (Abb. 3.23). So zeigen interessanterweise auch die innerhalb der T-Zellpopulation IR-resistenten Treg eine Expression von CD25, nicht aber Th und CTL.

Ein weiterer Fokus könnte auf dem Protein Akt1 liegen, das innerhalb der Signalweiterleitung des T-Zellrezeptors aktiviert wird (Genot et al., 2000). Untersuchungen des Einflusses einer Akt1-Inhibition auf den IR-induzierten Zelltod konnten hier nicht weiter ausgeführt werden, da eine Hemmung von Akt1 in Lymphozyten hoch toxisch war (im Anhang Abb. 6.16). In Tumorzellen konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Inhibition von Akt1 die Strahlensensitivität erhöht, indem die DNA-PK-abhängige DSB-Reparatur gehemmt wird (Toulany et al., 2008). Akt1 vermittelt somit eine Resistenz gegenüber IR und genotoxischen Agenzien (Liu, et al., 2014). Stimulierte Lymphozyten zeigten keinen Vorteil in der Reparatur von DSB im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 3.29/30). Dies bedeutet jedoch nicht, dass aktiviertes Akt1 in der stimulierten Population auf anderem Wege antiapoptotisch wirken kann.

Generell ist die Signalweiterleitung nach CD3- und CD28-Stimulation sehr komplex und führt zu einer erhöhten metabolischen Aktivität der Lymphozyten mit Folge einer Immunreaktion. Daher ist es schwierig, die Faktoren, die zur Protektion gegenüber IR führen, einzugrenzen. Vermutlich ist die Ausübung der Immunreaktion einer T-Zelle der Induktion des Zelltods vorrangig, wobei aktivierte T-Zellen im Sinne einer Homöostase und dem Vermeiden von Autoimmunreaktionen nach erledigter Immunantwort einer vorprogrammierten, intrinsischen Apoptose sterben (Panneerselvam et al., 2013).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Lymphozyten nach Aktivierung des T-Zellrezeptors CD3 und des Ko-Rezeptors CD28 eine Strahlenresistenz erlangen, die einhergeht mit einer massiven Caspaseaktivität, PARP-1 Spaltung und einer transkriptionellen Herunterregulation von ATM sowie einer verminderten Phosphorylierung von ATM nach Exposition mit IR. Unstimulierte Lymphozyten hingegen zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber IR und untergingen schon nach 12 h einen signifikanten, Caspase-unabhängigen Zelltod im Gegensatz zu stimulierten Zellen. Eine Hemmung von Faktoren der DNA-Schadensantwort wie ATM, des MRN-Komplexes (Inhibition von MRE11 durch Mirin) sowie der *Downstreamkinasen* CHK1 und CHK2 führte zur signifikanten Verminderung des IR-induzierten Zelltodes und somit zum Schutz unstimulierter Lymphozyten vor IR. Unterschiede in der Reparatur IR-induzierter DSB konnten zwischen unstimulierten und stimulierten Lymphozyten nicht festgestellt werden. Jedoch stellen die IR-induzierten DNA-Schaden und die damit verbundene Aktivierung der Proteine der DNA-Schadensantwort den Auslöser der Zelltodinduktion in Lymphozyten dar, wohingegen eine Stimulation des T-Zellrezeptors der Lymphozyten diesem Zelltodsignal entgegenwirkt.

4.5 Sensitivität von Lymphozyten gegenüber CDT und TMZ

Das bakterielle Toxin CDT wird wegen seiner Endonuklease-Aktivität und deren Eigenschaft DSB zu bilden als Radiomimetikum beschrieben (Fahrer et al., 2014). Im Vergleich unstimulierte vs. stimulierte Lymphozyten zeigten stimulierte Zellen nach CDT-Behandlung signifikant höhere Zelltodraten als unstimulierte Zellen (Abb. 3.52 A). Diese Beobachtung ist gegensätzlich zur Exposition mit IR und lässt sich vermutlich auf die erhöhte Proliferation der stimulierten Zellen zurückführen. Die Toxizität kann auf die Endonuklease-Aktivität der CDT Untereinheit CdtB abgeleitet werden, da die in der Untereinheit mutierte Variante CDTm keine Toxizität vermittelte (Abb. 3.52 B).

Ferner konnten nach CDT-Behandlung DSB in Form von γ H2AX ausschließlich nur in stimulierten Lymphozyten detektiert werden (Abb. 3.53). Dies könnte darin begründet sein, dass CDT nur in stimulierten Lymphozyten durch Endozytose aufgenommen wird bzw. einen retrograden Transport zum endoplasmatischen Retikulum und eine Translokation in den Zellkern erfährt. Der genaue Transportmechanismus bzw. die zelluläre Aufnahme müsste in weiteren Versuchen immunhistochemisch analysiert werden. Außerdem könnte mittels Alkalischem und Neutralen *Comet Assay* unterschieden werden, ob es sich bei den Schäden um DSB oder SSB handelt. Dass insbesondere stimulierte Lymphozyten sensitiver gegenüber CDT als unstimulierte Zellen sind, ist insbesondere im Kontext einer Infektion mit *Salmonella Typhimurium* und einer erst kürzlich erschienenen Publikation von Belluz et al. sehr interessant (Del Bel Belluz et al., 2016). In dieser Arbeit bezeichneten sie das Typhoid Toxin, ein dem CDT-ähnlichen Toxin mit einer CdtB-Untereinheit, als Immunmodulator. *Salmonella*

Typhimurium Infektionen gehen im Menschen ohne Symptome einher, da sie die Immunantwort unterdrücken und somit eine persistierende, systemische Infektion aufrechterhalten können, ohne dem Wirt zu schaden (Monack et al., 2004). Das könnte erklären, weshalb stimulierte Lymphozyten, die eine Immunreaktion gegen das Bakterium einleiten könnten, deutlich sensibler gegenüber CDT sind als unstimulierte Lymphozyten. In weiteren Publikationen konnte gezeigt werden, dass CDT die Proliferation von T- und B-Lymphozyten inhibiert, die Interferon- γ Sekretion von T-Zellen hemmt, Apoptose in Monozyten und aus Monozyten-ausgereiften DCs induziert sowie die Aktivität von DCs vermindert (Del Bel Belluz et al., 2016; Gelfanova et al., 1999; Shenker et al., 2001; Svensson et al., 2001; Wising et al., 2005; T. Xu et al., 2004). Die Frage, weshalb stimulierte Lymphozyten deutlich sensibler gegenüber CDT sind als nicht-stimulierte Zellen, ist für zukünftige Experimente zum Verständnis systemischer bakterieller Infektionen von äußerster Wichtigkeit und sollte in diesem Zusammenhang weiter untersucht werden.

Überdies wurde die Zelltodinduktion nach TMZ analysiert. TMZ ist ein methylierendes Agens, welches in der Therapie von Hirntumoren und malignen Melanomen eingesetzt wird (Naumann et al., 2009; Yung et al., 1999). Resistenz vermittelt MGMT, das die Methylgruppe an den Basen der DNA im aktiven Zentrum aufnimmt und entfernt (Pegg et al., 1995). Lymphozyten exprimieren MGMT (Roos et al., 2004) und zeigten weder im unstimulierten noch stimulierten Zustand eine deutliche Zelltodinduktion bis zu klinisch relevanten Dosen von 150 μ M (Abb. 3.54 A). Wird MGMT durch eine Vorbehandlung mit O⁶BG inhibiert, so zeigten insbesondere stimulierte Lymphozyten eine erhöhte Aktivierung des Zelltods schon nach sehr geringen Dosen von nur 6,25 – 25 μ M (Abb. 3.54 B). Eine erhöhte Toxizität gegenüber TMZ konnte auch für stimulierte Treg, Th und CTL festgestellt werden (Abb. 3.55 und 3.56). Innerhalb der jeweiligen T-Zellpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede im TMZ-vermittelten Zelltod festgestellt werden (direkte Gegenüberstellung nicht im Ergebnisteil dargestellt). Dass stimulierte Lymphozyten nach O⁶BG und TMZ sensibler als unstimulierte Lymphozyten sind, wurde 2009 von Roos *et al.* mittels SubG1-Messungen festgestellt. (Roos et al., 2004) Die Datenlage wurde hier auf AnnexinV/PI-Messungen und spezielle T-Zellpopulationen erweitert. Insbesondere die Proliferationseigenschaft der Zellen, die die Toxizität von TMZ vor allem bei geringen Dosen vermittelt, sowie die Hemmung von MGMT sind maßgebend für die erhöhte Toxizität auf stimulierte Lymphozyten. Es muss geschlussfolgert werden, dass eine Kombination von TMZ (+O⁶BG) mit einer Immuntherapie (zur Stimulation von T-Zellen) kontraproduktiv wäre, da durch TMZ aufgrund der erhöhten Sensibilität aktivierter T-Zellen die Effizienz der immuntherapeutischen Strategie abgeschwächt werden würde.

Die Behandlung von Glioblastomen mit TMZ inklusive der Depletion von MGMT führt zu Lymphopenien und drastischer Immunsuppression in Patienten (Sengupta et al., 2012). In einem Ratten-Glioblastoma-Modell konnte festgestellt werden, dass bei mehrmaliger Gabe

von TMZ in niedrigen Dosen (5 Tage/3 Wochen je 0,5 mg/kg) im Gegensatz zur Standardbehandlung (5 Tage je 30 mg/kg) zirkulierende Treg im Verhältnis zu Th depletiert werden (Banissi et al., 2009). In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zelltodinduktion zwischen Treg, Th und CTL nach TMZ beobachtet werden (Abb. 3.55 und 3.56). Es müsste *in vitro* überprüft werden, ob bei sehr geringen TMZ-Konzentrationen (z.B. 6,25 μ M) Treg mehr Zelltod einleiten als Th. Dies würde zusammen mit der Arbeit von Banissi et al. wichtige Erkenntnisse in der Anwendung von TMZ liefern, da eine spezifische Depletion Tumor-schützender Treg während der Hirntumorthherapie ein für den Patienten positiven Nebeneffekt hätte. Bei Änderungen hinsichtlich der Applikation von TMZ im Kontext einer Treg-Depletion sollte aber die Zerstörung der Tumorzellen als primäres Ziel nicht abgemildert werden.

4.6 Sensitivität von Lymphozyten, insbesondere von Treg, gegenüber Mafosfamid und die daraus resultierende Implikation für die Immunantwort

In Kombinationstherapien ist es erforderlich, die antitumorale Immunantwort nicht negativ zu beeinflussen sowie Methoden zu entwickeln, die gezielt Tumor-protective Treg depletieren (Hobeika et al., 2011). Behandlungen mit Cyclophosphamid führten in Tierversuchen und Patienten zu einer selektiven Depletion von Treg, was in einer gesteigerten antitumoralen Immunantwort resultierte (Ercolini et al., 2005; Ge et al., 2012; Ghiringhelli et al., 2004; Lutsiak et al., 2005). Dieser Zusammenhang zwischen einer Immunaktivierung nach niedrigen Dosen und einer Immunsuppression nach hohen Dosen Cyclophosphamid wurde als Nebenprojekt dieser Doktorarbeit publiziert und wird im Folgenden kurz beschrieben (im Detail siehe Heylmann et al., 2013). Die für die Experimente eingesetzten Mafosfamid-Dosen sind den in der Therapie ermittelten Plasmakonzentrationen von Cyclophosphamid angepasst, die direkt nach Applikation 12 – 18 μ g/ml, nach 24 h Level < 2,5 μ g/ml erreichen (Joy et al., 2012; Matthias et al., 1984). Es konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Dosen des Cyclophosphamid-Derivats Mafosfamid (0,5 μ g/ml) Treg signifikant mehr Zelltod einleiten als Th und CTL (Abb. 3.58 A). Da Treg immunhemmende Zellen sind, würde dies zu einer reduzierten Inhibition von Th und CTL und somit zu einer Immunstimulation führen. Bei höheren Dosen Mafosfamid (ab 1,5 μ g/ml) näherten sich die Zelltodwerte von Th und CTL den Werten von Treg an (siehe Heylmann et al., 2013). Da somit bei höheren Dosen auch T-Effektorzellen betroffen sind, würde dies in einer systemischen Immunsuppression resultieren. Die hohe Sensitivität von Treg ist spezifisch für das ICL-bildende Cyclophosphamid bzw. Mafosfamid, denn nach Behandlung mit Nimustin oder Mitomycin C, ebenfalls DNA-Crosslinker, konnten keine Unterschiede in der Zelltodinduktion zwischen Treg, Th und CTL festgestellt werden (Abb. 3.59). Acrolein, das während der Hydrolyse von Cyclophosphamid bzw. Mafosfamid als Intermediat entsteht und ein sehr potentes Gift ist, induzierte in den Zellen

nur einen leichten Anstieg an Apoptose, jedoch keinen Anstieg bei steigender Dosis (Heylmann et al., 2013).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Suppressionsfähigkeit Mafosfamid-behandelter aber weiterhin vitaler Treg vermindert ist. Mithilfe eines speziellen *in vitro* Suppressionsassays wurde ermittelt, dass Mafosfamid-behandelte Treg defizient in der Hemmung der Proliferation von Th sind als im Vergleich zu Mafosfamid-unbehandelten Treg. Zudem konnte in Treg nach Mafosfamid-Behandlung eine Abnahme der Helios-Expression detektiert werden. Helios ist ein Transkriptionsfaktor von Treg und speziell ein Marker der Treg-Aktivierung (Akimova et al., 2011). Dies macht deutlich, dass niedrige Dosen Mafosfamid nicht nur gezielt Treg durch Induktion des Zelltodes depletieren, sondern auch ihre Funktionalität reduziert wird. Da Mafosfamid vor allem *Interstrang-Crosslinks* (ICLs) in der DNA bildet, die über sehr komplexe Mechanismen repariert werden, wurde ein modifizierter *Comet Assay* zur Detektion von ICLs durchgeführt. Dieser zeigte nach MAF-Behandlung deutlich mehr ICLs in Treg im Vergleich zu Th und CTL und nach 24 h eine Abnahme der ICLs in Th und CTL, jedoch nicht in Treg. Dies lässt auf einen Defekt in der Crosslink-Reparatur in Treg schließen. Gleichzeitig konnten nach Mafosfamid innerhalb der ersten 6 h im Gegensatz zu Treg ein Anstieg von γ H2AX-Foci in Th und CTL, vermutlich aufgrund der Prozessierung des DNA-Schadens im Verlauf der ICL-Reparatur, festgestellt werden (siehe in Heylmann et al., 2013). 24 h nach Mafosfamid-Behandlung zeigten Treg deutlich γ H2AX-Foci, wahrscheinlich infolge nicht-reparierter ICLs und einer spät einsetzenden DDR, während kaum persistierende γ H2AX-Signale in Th und CTL detektiert wurden. Vergleicht man wiederum die Zelltodinduktion nach Mafosfamid in unstimulierten mit stimulierten Lymphozyten, so zeigte sich, dass unstimulierte Zellen signifikant mehr Zelltod einleiten und stimulierte Zellen deutlich resistenter sind (Abb. 3.57).

Neben Apoptose wurde auch Nekrose induziert. Auch hier stellt sich wiederum die Frage, weshalb proliferierende Lymphozyten resistenter gegen einen DNA-Schaden wie ICLs sind im Gegensatz zu nicht-proliferierenden Zellen. In zukünftigen Experimenten könnte ein modifizierter *Comet Assay* zur Analyse der ICL-Reparatur durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede in der Reparaturkapazität von unstimulierten und stimulierten Lymphozyten herausstellen zu können. Es zeigte sich, dass nach einer höheren Dosen Mafosfamid (1,5 μ g/ml) auch die stimulierten Zellen vermehrt Zelltod einleiten. Dies spricht wiederum für den Effekt der Immunstimulation nach niedrigen Dosen bzw. einer Immunsuppression nach hohen Dosen Mafosfamid. Es sterben somit signifikant mehr unstimulierte Lymphozyten nach niedrigen Dosen Mafosfamid als immunaktive, stimulierte Zellen. Der Schutzeffekt gegen Mafosfamid durch Stimulation des T-Zellrezeptors konnte auch in spezifischen T-Zellpopulationen wie Th und CTL nachgewiesen werden (experimentell durchgeführt, in dieser Arbeit nicht dargestellt), interessanterweise auch für Treg (Abb. 3.58 B). Dieser Effekt sollte in zukünftigen Treg-Depletionsstrategien mit Cyclophosphamid berücksichtigt und eine

zusätzliche Aktivierung des T-Zellrezeptors auf Treg bei einer Niedrigdosis-Therapie vermieden werden.

Treg regulieren die antitumorale Immunantwort (Schmidt et al., 2012). Die Anzahl an tumorinfiltrierenden Treg korreliert mit einer schlechten Prognose und mit geringeren Überlebenschancen der Patienten (Curiel et al., 2004; Jacobs et al., 2010). Selektive Depletionsstrategien für Treg mit niedrigen Dosen Cyclophosphamid stehen daher stark im Fokus der Tumorthherapie, insbesondere in Kombination mit weiteren therapeutischen Maßnahmen wie Immunvakzinierungen (CTLA-4, PD1), adaptivem T-Zelltransfer und ionisierender Strahlung (Begg et al., 2011; Vanneman & Dranoff, 2012). Ziel ist es, das normale Gewebe und Blutzellen zu schützen, den Tumor zu schädigen und die Infiltration antitumoraler Effektor-T-Zellen zu fördern.

4.7 Überblick und mögliche translationale Umsetzung in der Kombinationstherapie bei Krebs

1. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen der lymphoiden Reihe wie T-, B-, NK-Zellen sowie CD34+ Vorläuferzellen signifikant sensitiver gegenüber IR sind als Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen. Granulozyten sterben aufgrund ihrer natürlichen Kurzlebigkeit früh nach ihrer Isolation in Kultur und werden in ihrer Viabilität nicht durch IR beeinflusst.
2. Zwischen den hier untersuchten Blutzellen konnten keine signifikanten Unterschiede in der DSB-Reparatur mittels γ H2AX-Foci Assay ermittelt werden. In Blutproben von Patienten, die einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt waren, zeigten T-Zellen deutlich mehr γ H2AX-Foci als Monozyten. Granulozyten zeigten keine γ H2AX-Foci, weder in *in vitro* Versuchen, noch in Blutproben von Patienten während einer Ganzkörperbestrahlung. In einer mitbetreuten Masterarbeit (Haak) wurde zudem gezeigt, dass Granulozyten eine Defizienz in der Reparatur von DSB aufgrund herabregulierter DNA-Reparatur Proteinen und Faktoren der DDR aufweisen.
3. Weiterhin wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, aus nur einem aus der Fingerspitze entnommenen Tropfen Blut DNA-Schäden in Form von γ H2AX in spezifischen Blutzellpopulationen immunhistochemisch anzufärben und zu quantifizieren, sowie die individuelle DNA-Schadensreparatur zu bestimmen. Diese sog. Blutropfenmethode (BDM) birgt hohes Potential für zukünftige diagnostische Verfahren im Bereich radiobiologischer Bestimmungen, Feldstudien an größeren Populationen, Mausexperimenten und der personalisierten Krebstherapie, um den Einfluss äußerer Faktoren wie z.B. IR, Chemotherapeutika, *Lifestyle-Drugs* oder Nahrungsergänzungsmitteln zu untersuchen. Sie ist einfach durchzuführen, kostengünstig, benötigt wenig Laborausstattung im Vergleich zu herkömmlichen Assays, ist auf mehrere Blutzellpopulationen und weitere Proteinmarker in Ko-

Färbung erweiterbar. Die Proben können über mehrere Tage als Blutaustrich ohne sofortige Fixierung und Färbung gelagert werden.

4. T-Zellen sind die strahlensensitivsten Zellen des hämatopoetischen Systems. Hier wurde untersucht, über welche Signalwege T-Zellen sterben und wieso sie eine Strahlenresistenz erlangen, wenn der CD3 T-Zellrezeptor und CD28 Ko-Rezeptor aktiviert werden, wie es in Immunreaktionen geschieht. Eine Stimulation der Lymphozyten bewirkte eine Aktivierung der Caspasen und eine Spaltung von PARP-1 sowie eine Expression des FasR und leichte Induktion von p53. Eine Behandlung mit IR zeigte jedoch in stimulierten Zellen eine signifikant geringere Zelltodinduktion im Vergleich zu unstimulierten Lymphozyten. Unstimulierte Zellen untergingen einen Caspase-unabhängigen Zelltod mit apoptotischen Signalen (AnnexinV positiv) und zeigten eine deutlich höhere DNA Fragmentierung als ihr stimulierter Gegenpart. Unterschiede in der IR-vermittelten Induktion des Tumorsuppressors und Transkriptionsfaktors p53 und dessen Phosphorylierung an Ser15 und Ser46 konnte zwischen stimulierten und unstimulierten Lymphozyten nicht festgestellt werden.

Pan-Caspase-Inhibitoren wie auch spezielle Inhibitoren für Caspase-2 zeigten keinen Effekt auf den IR-vermittelten Zelltod in unstimulierten wie auch stimulierten Lymphozyten. Ebenfalls gaben Caspase-1 Western Blots keine Hinweise auf ein Einleiten der Pyroptose. Dies wurde durch Caspase-1-Inhibitoren bestätigt, die keine Wirkung auf den Strahlen-induzierten Zelltod hatten. Auch der PARP-Inhibitor Olaparib zeigte keine Wirkung auf die Strahlensensitivität der Zellen; eine AIF-Translokation in den Zellkern konnte nicht beobachtet werden, wodurch der Parthanatos genannte Zelltodweg ausgeschlossen werden kann. Ferner hatte der Inhibitor von RIP1 (Nekrostatin), ein wichtiger Auslöser der sog. Nekroptose, keinen Einfluss auf den IR-induzierten Zelltod von Lymphozyten.

Interessanterweise bewirkte jedoch die Hemmung der DDR-Faktoren ATM aber auch des MRN-Komplexes (Mre11) sowie CHK1 und CHK2 einen signifikanten Schutz gegenüber IR in unstimulierten Lymphozyten, nicht aber nach Inhibition von DNA-PK. Deutlich erhöhte Signale von pATM wurden nach IR in unstimulierten im Gegensatz zu stimulierten Zellen beobachtet. Auf Genexpressionsebene war ATM einer der wenigen Faktoren, die in stimulierten Lymphozyten herunterreguliert wurden.

Stimulierte Lymphozyten zeigten eine transkriptionelle Hochregulation von Survivin und MTH1. Beide Gene codieren für Proteine, die für ein Überleben im Zusammenhang einer IR-Exposition stehen könnten. Eine Inhibition von Survivin bzw. MTH1 zeigte jedoch keinen Einfluss auf den IR-induzierten Zelltod, wenngleich die Inhibition von MTH1 in stimulierten Lymphozyten signifikant mehr Zelltod auslöste als in unstimulierten Zellen. Die erhöhte transkriptionelle Expression von MTH1 geht einher mit einer erhöhten Menge an ROS, die in stimulierten Lymphozyten gemessen wurde.

Zusammengefasst ist der DNA-Schaden, der durch IR verursacht wird, bzw. dessen Erkennung durch die DDR Auslöser für den Zelltod in Lymphozyten, auch wenn die DNA-Schäden (SSB und DSB) effizient in stimulierten als auch unstimulierten Lymphozyten repariert werden. Unklar bleibt weiterhin, welche Signalwege ausgehend von MRN, ATM, CHK1 und CHK2 letztendlich DNA-Fragmentierung und Apoptose auslösen.

5. Das bakterielle Toxin und „Radiomimetikum“ CDT bewirkt gegensätzliche Effekte in Lymphozyten als IR. Stimulierte Lymphozyten sind hoch sensitiv gegenüber CDT als unstimulierte Zellen und zeigen signifikant mehr DSB in Form von γ H2AX. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, vor allem im Zusammenhang systemischer, bakterieller Infektionen und dem Entkommen der Bakterien vor dem Immunsystem des Wirts.

6. Gegenüber dem Chemotherapeutikum TMZ konnte nur nach Depletion (O^6 BG) des Resistenzfaktors MGMT und auch nur in stimulierten Lymphozyten ein deutlicher Zelltod, in diesem Falle auch Nekrose, induziert werden.

7. Das Zytostatikum und Derivat von Cyclophosphamid Mafosfamid hingegen zeigte bei niedrigen Dosen erhöhte Toxizität in unstimulierten Lymphozyten, wobei bei höheren Dosen auch die stimulierten Zellen vermehrt Apoptose und Nekrose einleiteten. Dies könnte ein weiterer Hinweis sein, weshalb niedrige Dosen Mafosfamid zu einer Immunstimulation (geringe Toxizität für stimulierte Zellen) und hohe Dosen zu einer Immunsuppression (höhere Toxizität für stimulierte Zellen) führen. Eine Immunstimulation nach einer Niedrigdosis-Therapie mit Cyclophosphamid/Mafosfamid kann auf eine selektive Toxizität gegenüber immuninhibierender Treg, die signifikant mehr Zelltod eingehen als die Effektorzellen Th und CTL, geschlossen werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Mafosfamid die immunhemmende Aktivität von Treg reduziert sowie Treg im Vergleich zu Th und CTL defizient in der Reparatur von ICLs sind, die durch Mafosfamid erzeugt werden (siehe hierzu die Publikation Heylmann et al., 2013).

Die hier gezeigten Daten sind überaus wichtig, um das Verhalten von Blutzellen sowie eine Immunsuppression als Nebenwirkung der Strahlen- und Chemotherapie abwägen und den Einfluss auf eine mögliche antitumorale Immunantwort beschreiben zu können. Dies ist gerade für Kombinationsbehandlungen in der Krebstherapie von außerordentlicher Bedeutung. Denn nur Kombinationen unterschiedlicher Behandlungsmethoden können einen Erfolg in der Bekämpfung heterogener Tumorzellen vermitteln. Kombinationsstrategien stehen zurzeit sehr im Mittelpunkt der Krebsforschung und -therapie. Diese bestehen z.B. aus einer Kombination aus IR und gleichzeitiger pharmakologischer Modulation von Signalwegen (z.B. Akt, NF- κ B, ATM), um die Strahlenresistenz von Tumorzellen zu reduzieren. Sinnvoll ist dabei auch die Reduktion von Schäden am gesunden Gewebe bzw. dessen Stimulation zur Wiederherstellung (z.B. *Recovery* von Blutzellen durch Zytokine) (Begg et al., 2011).

Kombinationen können auch aus unterschiedlichen Immuntherapien zusammengesetzt sein, wie die Injektion von Tumorstoffen mit gleichzeitiger Gabe von Immun-*Checkpoint*-Inhibitoren (CTLA-4, PD1). Zusätzlich ist die Kombination der konventionellen Chemotherapie mit Immuntherapie ein vielversprechendes Modell. So führt IR zur Entlassung von Tumorantigenen und kann dadurch die Immuntherapie verstärken. Cyclophosphamid (Treg ↓) zusammen mit Tumorstoffen (Th, CTL ↑) sind weitere mögliche Ansätze, als auch eine Kombination von CTLA-4-Antikörpern mit der klassischen Chemotherapie, die das Überleben von Melanompatienten erfolgreich verlängern kann (Vanneman & Dranoff, 2012).

Eine mögliche Behandlungsstrategie bestehend aus Strahlentherapie mit zytotoxischer Chemotherapie, Immuntherapie (zur Aktivierung antitumoraler T-Zellen) und pharmakologischer Inhibitoren (ATMi, CHK1/2i) könnte wie in Abb. 4.2 gezeigt aussehen. Erste Studien bezüglich zeitlicher Gabe und geeigneter Dosen (fraktioniert, Vor- oder Nachbehandlung) müssten vorab in Maus-Tumormodellen festgelegt werden.

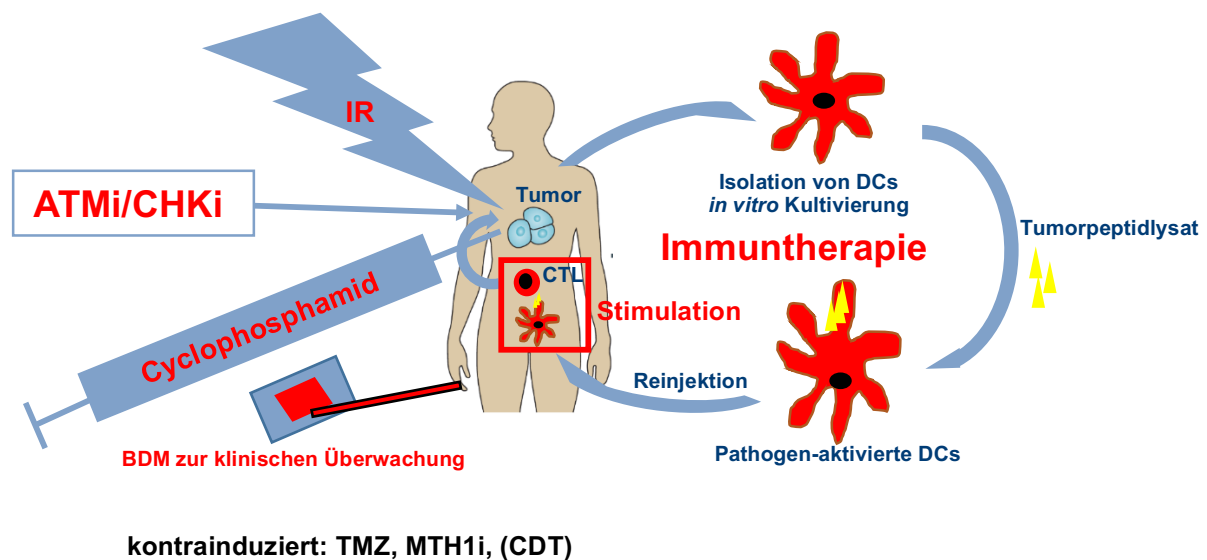


Abb. 4.2: Vorschlag einer Kombinationstherapie bei der Behandlung von Krebs. Ziel ist ein hoch-effizienter antitumoraler Effekt mit Schutz oder einer Aktivierung von Immunzellen. Eine Vakzinierung mit Tumorpeptid-geprägten DCs bewirkt systemisch und in der Tumorumgebung eine Aktivierung von T-Effektorzellen gegen tumorale Antigene (Tacken et al., 2007). Eine zeitgleiche Bestrahlung des Tumors würde die Krebszellen schädigen, wohingegen die strahlenresistenten DCs und die durch Aktivierung strahlenresistent-werdenden T-Zellen in ihrer Immunantwort nicht beeinflusst werden. Eine zusätzliche Gabe von ATM-, MRN- oder CHK1/2-Inhibitoren könnte dabei Lymphozyten vor IR schützen, einer Immunsuppression entgegenwirken und gleichzeitig Tumorzellen gegenüber IR sensitivieren. Niedrige Dosen Cyclophosphamid depletieren selektiv Tumor-schützende Treg, jedoch kaum T-Effektorzellen wie Th und CTL oder aktivierte T-Zellen. Als Überwachung und Validierung der Dosen könnte die BDM eingesetzt werden. Kontraindiziert aufgrund der Toxizität gegenüber aktivierte T-Zellen wäre eine Behandlung des Patienten mit O⁶BG und TMZ, mit dem MTH1-Inhibitor TH588 und, sollte es in der Therapie Anwendung finden bzw. der Patient eine hochgradige, bakterielle Infektion aufweisen, mit dem Radiomimetikum CDT. Ein solcher Kombinationsansatz aus IR, Chemotherapie, pharmakologischer Inhibitoren und einer immuntherapeutischen Intervention müsste in zukünftigen Mausversuchen in einem geeigneten Tumormodell getestet und etabliert werden. (Patientenabbildung aus Restifo et al. 2012)

Dosen und zeitliche Gabe der Interventionen müssten so gewählt werden, dass der therapeutische Effekt maximal gegen den Tumor gerichtet ist, dabei aber die antitumorale Immunantwort der Immuntherapie nicht abgeschwächt wird bzw. zeitgleich Tumor-schützende Treg depletiert werden. Die BDM könnte als diagnostische Überwachung des Patienten während der Therapie angewendet werden, um die Dosen der verwendeten Pharmaka und γ -Strahlung anhand der DNA-Schäden in T-Zellen anzupassen. Dadurch könnte eine höchstmöglich erträgliche Dosis für den Patienten ermittelt und die effizienteste Dosis zur Zerstörung der Krebszellen bestimmt und eingesetzt werden. Insbesondere die hier verwendeten ATM- und CHK1/2-Inhibitoren könnten einen großen Vorteil in einer Kombinationstherapie darstellen, da sie Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen und IR sensitivieren, aber zeitgleich Lymphozyten vor IR-induziertem Zelltod schützen.

5 Referenzen

- Agency, I. A. E. (2001). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. *Technical Report Series, No 405, Vienna: IAEA*.
- Agrawal, A., & Gupta, S. (2011). Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Res Rev*, 10(3), 336-345. doi: 10.1016/j.arr.2010.06.004
- Ahmad, M., Rees, R. C., & Ali, S. A. (2004). Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 53(10), 844-854. doi: 10.1007/s00262-004-0540-x
- Ahmed, H. J., Svensson, L. A., Cope, L. D., Latimer, J. L., Hansen, E. J., Ahlman, K., . . . Lagergard, T. (2001). Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol*, 50(10), 860-864. doi: 10.1099/0022-1317-50-10-860
- Aifantis, I., Raetz, E., & Buonamici, S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*, 8(5), 380-390. doi: 10.1038/nri2304
- Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H., & Hancock, W. W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*, 6(8), e24226. doi: 10.1371/journal.pone.0024226
- Akiyama, M. (1995). Late effects of radiation on the human immune system: an overview of immune response among the atomic-bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 68(5), 497-508.
- Aktories, Förstermann, Hofmann, & Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban & Fischer, 9. Auflage*.
- Akushevich, I. V., Veremeyeva, G. A., Dimov, G. P., Ukraintseva, S. V., Arbeev, K. G., Akleyev, A. V., & Yashin, A. I. (2011). Modeling hematopoietic system response caused by chronic exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys*, 50(2), 299-311. doi: 10.1007/s00411-011-0351-3
- Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S., & Sekaly, R. P. (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med*, 190(12), 1879-1890.
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell. T Cells and MHC Proteins*. (4th ed.): New York: Garland Science.
- Aldridge, D. R., & Radford, I. R. (1998). Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res*, 58(13), 2817-2824.
- Alexander, W. S. (1998). Cytokines in hematopoiesis. *Int Rev Immunol*, 16(5-6), 651-682.
- Allen, L. A. (2001). The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis*, 14(3), 273-277.
- Altieri, D. C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 22(53), 8581-8589. doi: 10.1038/sj.onc.1207113
- Altieri, D. C. (2008). Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 8(1), 61-70. doi: 10.1038/nrc2293
- Alvarez, L. E., Eastham, S. D., & Barrett, S. R. (2016). Radiation dose to the global flying population. *J Radiol Prot*, 36(1), 93-103. doi: 10.1088/0952-4746/36/1/93
- Ame, J. C., Spenlehauer, C., & de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays*, 26(8), 882-893. doi: 10.1002/bies.20085
- Anderson, L., Henderson, C., & Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol Cell Biol*, 21(5), 1719-1729. doi: 10.1128/MCB.21.5.1719-1729.2001
- Ando, K., Kernan, J. L., Liu, P. H., Sanda, T., Logette, E., Tschopp, J., . . . Sidi, S. (2012). PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. *Mol Cell*, 47(5), 681-693. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.024
- Arakawa, H., Bednar, T., Wang, M., Paul, K., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A. A., & Iliakis, G. (2012). Functional redundancy between DNA ligases I and III in DNA replication in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res*, 40(6), 2599-2610. doi: 10.1093/nar/gkr1024
- Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E. C., Su, D., . . . Palucka, A. K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med*, 204(5), 1037-1047. doi: 10.1084/jem.20061120
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190(7), 995-1004.

- Attia, P., Maker, A. V., Haworth, L. R., Rogers-Freezer, L., & Rosenberg, S. A. (2005). Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother*, 28(6), 582-592.
- Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279(53), 55117-55126. doi: 10.1074/jbc.M404524200
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499-506. doi: 10.1038/nature01368
- Banath, J. P., & Olive, P. L. (2003). Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 63(15), 4347-4350.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252. doi: 10.1038/32588
- Banissi, C., Ghiringhelli, F., Chen, L., & Carpentier, A. F. (2009). Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother*, 58(10), 1627-1634. doi: 10.1007/s00262-009-0671-1
- Barker, H. E., Paget, J. T., Khan, A. A., & Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*, 15(7), 409-425. doi: 10.1038/nrc3958
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2(6), 401-409. doi: 10.1038/nri819
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421-429.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*, 19(2), 238-245. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.009
- Bartova, E., Kozubek, S., Jirsova, P., Kozubek, M., Lukasova, E., Skalnikova, M., . . . Pasekova, R. (2001). Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma*, 110(5), 360-370. doi: 10.1007/s004120100141
- Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D., & Kaina, B. (2011). Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(52), 21105-21110. doi: 10.1073/pnas.1111919109
- Bauer, M., Goldstein, M., Heylmann, D., & Kaina, B. (2012). Human monocytes undergo excessive apoptosis following temozolomide activating the ATM/ATR pathway while dendritic cells and macrophages are resistant. *PLoS One*, 7(6), e39956. doi: 10.1371/journal.pone.0039956
- Baumann, P., & West, S. C. (1997). The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *EMBO J*, 16(17), 5198-5206. doi: 10.1093/emboj/16.17.5198
- Bebeshko, V. G., Chumak, A. A., & Bazika, D. A. (1991). Immunocompetent cells in patients who recovered from acute radiation sickness and children evacuated from the 30-km zone. *Proceedings of the National Conference on Scientific-Practical Aspects of Health Promotion of People Exposed to Radiation. Ministry of Health BSSR, Minsk*, 119-120.
- Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*, 11(4), 239-253. doi: 10.1038/nrc3007
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., & Stark, J. M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet*, 4(6), e1000110. doi: 10.1371/journal.pgen.1000110
- Benson, F. E., Stasiak, A., & West, S. C. (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J*, 13(23), 5764-5771.
- Berdelle, N., Nikolova, T., Quiros, S., Efferth, T., & Kaina, B. (2011). Artesunate induces oxidative DNA damage, sustained DNA double-strand breaks, and the ATM/ATR damage response in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 10(12), 2224-2233. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0534
- Berte, N., Lokan, S., Eich, M., Kim, E., & Kaina, B. (2016). Artesunate enhances the therapeutic response of glioma cells to temozolomide by inhibition of homologous recombination and senescence. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.11972
- Bezine, E., Vignard, J., & Mirey, G. (2014). The cytolethal distending toxin effects on Mammalian cells: a DNA damage perspective. *Cells*, 3(2), 592-615. doi: 10.3390/cells3020592
- Bhide, S. A., & Nutting, C. M. (2010). Recent advances in radiotherapy. *BMC Med*, 8, 25. doi: 10.1186/1741-7015-8-25
- Billadeau, D. D., Nolz, J. C., & Gomez, T. S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol*, 7(2), 131-143. doi: 10.1038/nri2021
- Bluestone, J. A., & Tang, Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol*, 17(6), 638-642. doi: 10.1016/j.coi.2005.09.002

- Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C. T., Wang, J. H., Wesemann, D. R., Zhang, T., . . . Alt, F. W. (2010). Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7), 3034-3039. doi: 10.1073/pnas.0915067107
- Bocker, W., & Iliakis, G. (2006). Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat Res*, 165(1), 113-124.
- Borde, V., & Cobb, J. (2009). Double functions for the Mre11 complex during DNA double-strand break repair and replication. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(6), 1249-1253. doi: 10.1016/j.biocel.2008.12.013
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Botto, M., Kirschfink, M., Macor, P., Pickering, M. C., Wurzner, R., & Tedesco, F. (2009). Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol*, 46(14), 2774-2783. doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.029
- Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 15(7), 713-720. doi: 10.1038/ncb2788
- Brahmer, J. R. (2014). Immune checkpoint blockade: the hope for immunotherapy as a treatment of lung cancer? *Semin Oncol*, 41(1), 126-132. doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.12.014
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., . . . Wigginton, J. M. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 366(26), 2455-2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200694
- Briegert, M., & Kaina, B. (2007). Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res*, 67(1), 26-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3712
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535. doi: 10.1126/science.1092385
- Broere, F., Apasov, S. G., Sitkovsky, M. V., & van Eden, W. (2011). A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In F. P. Nijkamp & J. M. Parnham (Eds.), *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition* (pp. 15-27). Basel: Birkhäuser Basel.
- Brown, K. D., Rathi, A., Kamath, R., Beardsley, D. I., Zhan, Q., Mannino, J. L., & Baskaran, R. (2003). The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Genet*, 33(1), 80-84. doi: 10.1038/ng1052
- Bubeck Wardenburg, J., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., . . . Findell, P. R. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem*, 271(33), 19641-19644.
- Buchmann, K. (2014). Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Front Immunol*, 5, 459. doi: 10.3389/fimmu.2014.00459
- Burkhardt, J. K., Carrizosa, E., & Shaffer, M. H. (2008). The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 26, 233-259. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347
- Burkle, A. (2001). PARP-1: a regulator of genomic stability linked with mammalian longevity. *ChemBiochem*, 2(10), 725-728.
- Buzzeo, M. P., Scott, E. W., & Cogle, C. R. (2007). The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia. *Leukemia*, 21(8), 1619-1627. doi: 10.1038/sj.leu.2404768
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2008). Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res*, 41(8), 1075-1083. doi: 10.1021/ar700245e
- Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H. C., Choksi, S., Liu, J., . . . Liu, Z. G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol*, 16(1), 55-65. doi: 10.1038/ncb2883
- Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P., & Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*, 24(22), 4387-4394.
- Callahan, M. K., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. (2014). CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol*, 4, 385. doi: 10.3389/fonc.2014.00385
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 729-740. doi: 10.1038/nrm2233
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., . . . Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281(5383), 1677-1679.

- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M. T., Bonmassar, E., Jiricny, J., & D'Atri, S. (2004). DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol*, 66(3), 478-491. doi: 10.1124/mol.66.3.
- Carloni, M., Meschini, R., Ovidi, L., & Palitti, F. (2001). PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. *Mutagenesis*, 16(2), 115-120.
- Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5(10), 981-986. doi: 10.1038/ni1113
- Cartwright, G. E., Athens, J. W., & Wintrobe, M. M. (1964). The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Man. *Blood*, 24, 780-803.
- Castelo-Branco, C., & Soveral, I. (2014). The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol*, 30(1), 16-22. doi: 10.3109/09513590.2013.852531
- Cathcart, M. K. (2004). Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(1), 23-28. doi: 10.1161/01.ATV.0000097769.47306.12
- Ceelen, L. M., Decostere, A., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2006). Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol Res*, 161(2), 109-120. doi: 10.1016/j.micres.2005.04.002
- Chan, E. Y., Kir, S., & Tooze, S. A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, 282(35), 25464-25474. doi: 10.1074/jbc.M703663200
- Chan, G., Nogalski, M. T., & Yurochko, A. D. (2012). Human cytomegalovirus stimulates monocyte-to-macrophage differentiation via the temporal regulation of caspase 3. *J Virol*, 86(19), 10714-10723. doi: 10.1128/JVI.07129-11
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chapman, J. R., Taylor, M. R., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, 47(4), 497-510. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.029
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., & Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, 14(3), 278-288.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., & Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13777-13782.
- Chen, G., Yuan, S. S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., . . . Lee, E. Y. (1999). Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem*, 274(18), 12748-12752.
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W. T., Song, Y., . . . Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*, 24(1), 105-121. doi: 10.1038/cr.2013.171
- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137(6), 1112-1123. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037
- Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S., & Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, 20(5), 801-809. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.003
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., . . . Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell*, 31(1), 33-46. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.016
- Christmann, M., Fritz, G., & Kaina, B. (2007). *Induction of DNA repair genes in mammalian cells in response to genotoxic stress* (E. Lankenau Ed. Vol. 1). Genome Dynamics and Stability: Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P., & Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 193(1-2), 3-34.
- Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), 616-627. doi: 10.1038/nrm2450
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., & Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*, 133(1), 157-165.
- Coffman, R. L., Seymour, B. W., Hudak, S., Jackson, J., & Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science*, 245(4915), 308-310.
- Collado, M., & Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer*, 6(6), 472-476. doi: 10.1038/nrc1884

- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., . . . Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566-569. doi: 10.1038/nature06306
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815-822. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.001
- Corces-Zimmerman, M. R., & Majeti, R. (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*, 28(12), 2276-2282. doi: 10.1038/leu.2014.211
- Correale, P., Botta, C., Cusi, M. G., Del Vecchio, M. T., De Santi, M. M., Gori Savellini, G., . . . Tagliaferri, P. (2012). Cetuximab +/- chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro. *Int J Cancer*, 130(7), 1577-1589. doi: 10.1002/ijc.26181
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T., & Thelestam, M. (2000). Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun*, 68(12), 6903-6911.
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M., & Frisan, T. (2001). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J Biol Chem*, 276(7), 5296-5302. doi: 10.1074/jbc.M008527200
- Cox, J. A., K. (2010). *Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results* (P. M. Elsevier Ed. 9th ed.).
- Critchlow, S. E., & Jackson, S. P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, 23(10), 394-398.
- Crompton, J. G., Narayanan, M., Cuddapah, S., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Yang, W., . . . Restifo, N. P. (2016). Lineage relationship of CD8(+) T cell subsets is revealed by progressive changes in the epigenetic landscape. *Cell Mol Immunol*, 13(4), 502-513. doi: 10.1038/cmi.2015.32
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., . . . Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), 942-949. doi: 10.1038/nm1093
- Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K., & Blasiak, J. (2015). Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci*, 16(2), 2641-2662. doi: 10.3390/ijms16022641
- da Silva, L. C., & Correia, M. T. (2014). Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol*, 5, 20. doi: 10.3389/fmicb.2014.00020
- Dahm-Daphi, J., & Dikomey, E. (1996). Rejoining of DNA double-strand breaks in X-irradiated CHO cells studied by constant- and graded-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol*, 69(5), 615-621.
- Dalal, S. N., Schweitzer, C. M., Gan, J., & DeCaprio, J. A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol*, 19(6), 4465-4479.
- Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A., & Finch, C. A. (1976). Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 58(3), 705-715. doi: 10.1172/JCI108517
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., & Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 39(25), 7559-7569.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., & Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377(6548), 446-448. doi: 10.1038/377446a0
- Darrah, P. A., Patel, D. T., De Luca, P. M., Lindsay, R. W., Davey, D. F., Flynn, B. J., . . . Seder, R. A. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*, 13(7), 843-850. doi: 10.1038/nm1592
- Davar, D., Beumer, J. H., Hamieh, L., & Tawbi, H. (2012). Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem*, 19(23), 3907-3921.
- David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 1116-1128.
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435-492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., & Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34(9), 2480-2488. doi: 10.1002/eji.200425274
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., . . . Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 4(5), 313-321. doi: 10.1038/nchembio.83
- Del Bel Belluz, L., Guidi, R., Pateras, I. S., Levi, L., Mihaljevic, B., Rouf, S. F., . . . Frisan, T. (2016). The Typhoid Toxin Promotes Host Survival and the Establishment of a Persistent Asymptomatic Infection. *PLoS Pathog*, 12(4), e1005528. doi: 10.1371/journal.ppat.1005528
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104(6), 1129-1137. doi: 10.1002/cncr.21324

- Deman, J., & Van Larebeke, N. (2001). Carcinogenesis: mutations and mutagens. *Tumour Biol*, 22(3), 191-202. doi: 50615
- Dianov, G., Price, A., & Lindahl, T. (1992). Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol*, 12(4), 1605-1612.
- DiBiase, S. J., Zeng, Z. C., Chen, R., Hyslop, T., Curran, W. J., Jr., & Iliakis, G. (2000). DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res*, 60(5), 1245-1253.
- DiGiusto, D., Chen, S., Combs, J., Webb, S., Namikawa, R., Tsukamoto, A., . . . Galy, A. H. (1994). Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*, 84(2), 421-432.
- Dillman, R. O. (2011). Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*, 26(1), 1-64. doi: 10.1089/cbr.2010.0902
- Dimitrova, N., & de Lange, T. (2006). MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. *Genes Dev*, 20(23), 3238-3243. doi: 10.1101/gad.1496606
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., . . . et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367.
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-550. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J. M., & Ferguson, D. O. (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), 808-813. doi: 10.1038/nsmb.1639
- DKFZ, Krebsinformationsdienst (2012). Leukämien bei Erwachsenen: Häufigkeit, Auslöser, Symptome. Heidelberg. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/leukaemien/ueberblick.php>
- Dougan, M., & Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*, 27, 83-117. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132544
- Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B., Xu, X., & Lees-Miller, S. P. (2010). Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol*, 30(6), 1368-1381. doi: 10.1128/MCB.00741-09
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11-22. doi: 10.1038/nrc969
- Dresch, C., Najean, Y., & Bauchet, J. (1975). Kinetic studies of 51Cr and DF32P labelled granulocytes. *Br J Haematol*, 29(1), 67-80.
- Dumitru, C. A., Moses, K., Trellakis, S., Lang, S., & Brandau, S. (2012). Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*, 61(8), 1155-1167. doi: 10.1007/s00262-012-1294-5
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991
- Eadie, J. S., Conrad, M., Toorchen, D., & Topal, M. D. (1984). Mechanism of mutagenesis by O6-methylguanine. *Nature*, 308(5955), 201-203.
- Eggler, A. L., Inman, R. B., & Cox, M. M. (2002). The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J Biol Chem*, 277(42), 39280-39288. doi: 10.1074/jbc.M204328200
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A. K., & Rizzi, M. (2014). B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14(5), 434. doi: 10.1007/s11882-014-0434-8
- Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(11), 638-647. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.146
- eMC, electronic Medicines Compendium. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/31421> (Stand: 04.02.2017)
- Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D., Flores, C., White, L., & Preston, C. R. (2007). A third link connecting aging with double strand break repair. *Cell Cycle*, 6(2), 131-135. doi: 10.4161/cc.6.2.3758
- Environmental Protection Agency (EPA, 2007). United States. Ionizing Radiation Fact Book. EPA , Office of Radiation and Indoor Air. Vol. 402-F-06-061.
- Ercolini, A. M., Ladle, B. H., Manning, E. A., Pfannenstiel, L. W., Armstrong, T. D., Machiels, J. P., . . . Jaffee, E. M. (2005). Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med*, 201(10), 1591-1602. doi: 10.1084/jem.20042167
- Erttmann, S. F., Hartlova, A., Sloniecka, M., Raffi, F. A., Hosseinzadeh, A., Edgren, T., . . . Gekara, N. O. (2016). Loss of the DNA Damage Repair Kinase ATM Impairs Inflammasome-Dependent Anti-Bacterial Innate Immunity. *Immunity*, 45(1), 106-118. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.018

- Etherington, G., Zhang, W., Harrison, J., & Walsh, L. (2014). Worker doses and potential health effects resulting from the accident at the Fukushima nuclear power plant in 2011. *Int J Radiat Biol*, 90(11), 1088-1094. doi: 10.3109/09553002.2014.942920
- Exogen Biotechnology, QB3 East Bay Innovation Center, Berkeley California, <https://exogenbio.com>, Stand 2017
- Eyigor, A., Dawson, K. A., Langlois, B. E., & Pickett, C. L. (1999). Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl Environ Microbiol*, 65(4), 1501-1505.
- Fadul, C. E., Fisher, J. L., Gui, J., Hampton, T. H., Cote, A. L., & Ernstoff, M. S. (2011). Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*, 13(4), 393-400. doi: 10.1093/neuonc/noq204
- Fahrer, J., Huelsenbeck, J., Jaurich, H., Dorsam, B., Frisan, T., Eich, M., . . . Fritz, G. (2014). Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)*, 18, 31-43. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.03.002
- Falck, J., Coates, J., & Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033), 605-611. doi: 10.1038/nature03442
- Falkenbach, A., Kovacs, J., Franke, A., Jorgens, K., & Ammer, K. (2005). Radon therapy for the treatment of rheumatic diseases--review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Rheumatol Int*, 25(3), 205-210. doi: 10.1007/s00296-003-0419-8
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., . . . Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4(12), 1206-1212. doi: 10.1038/ni1003
- Fantuzzi, G., & Dinarello, C. A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol*, 19(1), 1-11.
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171(8), 2000-2016. doi: 10.1111/bph.12416
- Fatokun, A. A., Liu, J. O., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2013). Identification through high-throughput screening of 4'-methoxyflavone and 3',4'-dimethoxyflavone as novel neuroprotective inhibitors of parthanatos. *Br J Pharmacol*, 169(6), 1263-1278. doi: 10.1111/bph.12201
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., & Bryceson, Y. T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 115(11), 2167-2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M. L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., & Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell Microbiol*, 15(1), 1-15. doi: 10.1111/cmi.12028
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P. J., Morales, J. C., . . . Nussenzweig, A. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*, 4(12), 993-997. doi: 10.1038/ncb884
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., & Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 959-967. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.024
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73(4), 1907-1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6), 2081-2095.
- Foray, N., Priestley, A., Alsbeih, G., Badie, C., Capulas, E.P., Arlett, C.F. & Malaise, E.P. (1997) Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol*, 72(3), 271-83
- Foster, E. L., Simpson, E. L., Fredrikson, L. J., Lee, J. J., Lee, N. A., Fryer, A. D., & Jacoby, D. B. (2011). Eosinophils increase neuron branching in human and murine skin and in vitro. *PLoS One*, 6(7), e22029. doi: 10.1371/journal.pone.0022029
- Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blocher, D., & Adamczyk, C. (1980). Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. *Radiat Res*, 82(3), 498-510.
- Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., . . . Thompson, C. B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, 16(6), 769-777.

- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., . . . Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176(2), 231-241. doi: 10.1083/jcb.200606027
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., & Kasai, H. (2001). Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res*, 29(2), 449-454.
- Furuichi, M., Yoshida, M. C., Oda, H., Tajiri, T., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., & Sekiguchi, M. (1994). Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics*, 24(3), 485-490. doi: 10.1006/geno.1994.1657
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., . . . Pommier, Y. (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*, 278(22), 20303-20312. doi: 10.1074/jbc.M300198200
- Gad, H., Koolmeister, T., Jemth, A. S., Eshtad, S., Jacques, S. A., Strom, C. E., . . . Helleday, T. (2014). MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*, 508(7495), 215-221. doi: 10.1038/nature13181
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14(10), 1014-1022. doi: 10.1038/ni.2703
- Gatei, M., Young, D., Cersaletti, K. M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., . . . Khanna, K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet*, 25(1), 115-119. doi: 10.1038/75508
- Gaziev, A., & Shaikhaev, G. (2012). Limited Repair of Critical DNA Damage in Cells Exposed to Low Dose Radiation. *Current Topics in Ionizing Radiation Research InTech*. doi: 10.5772/33611
- Gaziev, A., & Shaikhaev, G. (2012). Limited Repair of Critical DNA Damage in Cells Exposed to Low Dose Radiation. *Current Topics in Ionizing Radiation Research InTech*. doi: 10.5772/33611
- Ge, Y., Domschke, C., Stoiber, N., Schott, S., Heil, J., Rom, J., . . . Schuetz, F. (2012). Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother*, 61(3), 353-362. doi: 10.1007/s00262-011-1106-3
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., & Simon, H. U. (2013). Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol*, 34(8), 398-409. doi: 10.1016/j.it.2013.04.002
- Gelfanova, V., Hansen, E. J., & Spinola, S. M. (1999). Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. *Infect Immun*, 67(12), 6394-6402.
- Genot, E., & Cantrell, D. A. (2000). Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 12(3), 289-294.
- Genot, E. M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B. M., Weiss, A., & Kramer, I. M. (2000). The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, 20(15), 5469-5478.
- Gey, C., & Seeger, K. (2013). Metabolic changes during cellular senescence investigated by proton NMR-spectroscopy. *Mech Ageing Dev*, 134(3-4), 130-138. doi: 10.1016/j.mad.2013.02.002
- Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., . . . Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34(2), 336-344. doi: 10.1002/eji.200324181
- Ghosal, G., & Chen, J. (2013). DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl Cancer Res*, 2(3), 107-129. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.01
- Gibson, B. A., & Kraus, W. L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(7), 411-424. doi: 10.1038/nrm3376
- Gnesutta, N., & Minden, A. (2003). Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4. *Mol Cell Biol*, 23(21), 7838-7848.
- Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., . . . Jackson, S. P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926), 952-956. doi: 10.1038/nature01445
- Goldstein, M., Roos, W. P., & Kaina, B. (2008). Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, 229(1), 20-32. doi: 10.1016/j.taap.2008.01.001
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32(1), 37-43. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.001

- Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., & Radding, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res*, 26(23), 5388-5393.
- Gonzalez-Mejia, M. E., & Doseff, A. I. (2009). Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 2413-2431.
- Gottlieb, T. M., & Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), 131-142.
- Gottschalk, R. A., Corse, E., & Allison, J. P. (2012). Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 188(3), 976-980. doi: 10.4049/jimmunol.1102964
- Gradwohl, G., Menissier de Murcia, J., Molinete, M., Simonin, F., & de Murcia, G. (1989). Expression of functional zinc finger domain of human poly(ADP-ribose)polymerase in E. coli. *Nucleic Acids Res*, 17(17), 7112.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., & Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*, 220, 169-182. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), 2840-2848. doi: 10.1182/blood-2004-03-0859
- Gruzdyev, G. P., Chistopolsky, A. S., & Suvorova, L. (1993). On the question of radiosensitivity of cellular elements of erythropoietic components of bone marrow. *Radiobiology and Radioecology*, 34, 587.
- Guerra, L., Nemec, K. N., Massey, S., Tatulian, S. A., Thelestam, M., Frisan, T., & Teter, K. (2009). A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim Biophys Acta*, 1793(3), 489-495. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.017
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B. N., Stenerlow, B., Holmes, R. K., Ploegh, H. L., . . . Frisan, T. (2005). Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol*, 7(7), 921-934. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00520.x
- Gumy-Pause, F., Wacker, P., & Sappino, A. P. (2004). ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia*, 18(2), 238-242. doi: 10.1038/sj.leu.2403221
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X., & Dunphy, W. G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. *Genes Dev*, 14(21), 2745-2756.
- Gupta, R. C., Golub, E. I., Wold, M. S., & Radding, C. M. (1998). Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(17), 9843-9848.
- Gurmanchuk, I. E., Kharitonik, G. D., & Sigalovich, E. E. (1991). Frequency and spectrum of immune deficient and immunopathological conditions in children living in radionuclide contaminated areas. *Proceedings of the National Conference on Scientific-Practical Aspects of Health Promotion of People Exposed to Radiation. Ministry of Health BSSR, Minsk*, 124-125.
- Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M., & Ward, D. C. (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(6), 2298-2302.
- Haak, T. (2016) Untersuchung der Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung in menschlichen Blutzellen, insbesondere Granulozyten. Masterarbeit, durchgeführt im Institut für Toxikologie, Universitätsmedizin Mainz
- Hall, E. G., A. (2006). Radiobiology for the Radiologist. In P. L. W. Wilkins (Ed.), (6th ed.).
- Hammarsten, O., DeFazio, L. G., & Chu, G. (2000). Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem*, 275(3), 1541-1550.
- Hammond, E. M., & Muschel, R. J. (2014). Radiation and ATM inhibition: the heart of the matter. *J Clin Invest*, 124(8), 3289-3291. doi: 10.1172/JCI77195
- Harboe, M., & Mollnes, T. E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med*, 12(4), 1074-1084. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00350.x
- Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M. A., . . . Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*, 82(5), 849-856.
- Hashimoto, S., Anai, H., & Hanada, K. (2016). Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ*, 38, 9. doi: 10.1186/s41021-016-0037-9
- Hassane, D. C., Lee, R. B., & Pickett, C. L. (2003). Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells. *Infect Immun*, 71(1), 541-545.
- Hayashi, T., Hayashi, I., Shinohara, T., Morishita, Y., Nagamura, H., Kusunoki, Y., . . . Nakachi, K. (2004). Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is

- associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH. *Mutat Res*, 556(1-2), 83-91. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.07.002
- He, J., Hu, Y., Hu, M., & Li, B. (2015). Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep*, 5, 13110. doi: 10.1038/srep13110
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 137(6), 1100-1111. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021
- He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., . . . Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res*, 25(12), 1285-1298. doi: 10.1038/cr.2015.139
- Heier, H. E., Christensen, I., Froland, S. S., & Engeset, A. (1975). Early and late effects of irradiation for seminoma testis on the number of blood lymphocytes and their B and T subpopulations. *Lymphology*, 8(3), 69-74.
- Heimberger, A. B., Abou-Ghazal, M., Reina-Ortiz, C., Yang, D. S., Sun, W., Qiao, W., . . . Fuller, G. N. (2008). Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res*, 14(16), 5166-5172. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0320
- Henkart, P. A. (1985). Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 3, 31-58. doi: 10.1146/annurev.iy.03.040185.000335
- Herman, A. E., Freeman, G. J., Mathis, D., & Benoist, C. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med*, 199(11), 1479-1489. doi: 10.1084/jem.20040179
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., . . . Weller, M. (2006). O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J Neurochem*, 96(3), 766-776. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., & Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, 76(6), 977-987.
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 44, 113-139. doi: 10.1146/annurev-genet-051710-150955
- Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K., & Kaina, B. (2013). Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. *PLoS One*, 8(12), e83384. doi: 10.1371/journal.pone.0083384
- Heylmann, D., & Kaina, B. (2016). The gammaH2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Sci Rep*, 6, 22682. doi: 10.1038/srep22682
- Heylmann, D., Rodel, F., Kindler, T., & Kaina, B. (2014). Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochim Biophys Acta*, 1846(1), 121-129. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.009
- Hiasa, M., Abe, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., Kido, S., . . . Matsumoto, T. (2009). GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*, 114(20), 4517-4526. doi: 10.1182/blood-2009-04-215020
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., . . . Mak, T. W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 287(5459), 1824-1827.
- Hirose, K. (2012). 2011 Fukushima Dai-ichi nuclear power plant accident: summary of regional radioactive deposition monitoring results. *J Environ Radioact*, 111, 13-17. doi: 10.1016/j.jenvrad.2011.09.003
- Hobeika, A. C., Morse, M. A., Osada, T., Peplinski, S., Lyster, H. K., & Clay, T. M. (2011). Depletion of human regulatory T cells. *Methods Mol Biol*, 707, 219-231. doi: 10.1007/978-1-61737-979-6_14
- Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., . . . Schmitz, M. L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*, 4(1), 1-10. doi: 10.1038/ncb715
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Luscher, B., Schuler, H., & Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci*, 35(4), 208-219. doi: 10.1016/j.tibs.2009.12.003
- Hu, X., Nesic, D., & Stebbins, C. E. (2006). Comparative structure-function analysis of cytolethal distending toxins. *Proteins*, 62(2), 421-434. doi: 10.1002/prot.20767
- Huang, X., Tran, T., Zhang, L., Hatcher, R., & Zhang, P. (2005). DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4), 1065-1070. doi: 10.1073/pnas.0409130102

- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat Struct Mol Biol*, 17(1), 11-16. doi: 10.1038/nsmb.1710
- Hyka-Nouspikel, N., Lemonidis, K., Lu, W. T., & Nouspikel, T. (2011). Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation. *Blood*, 117(23), 6277-6286. doi: 10.1182/blood-2010-12-326637
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Radiation. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100D. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304362/>
- Iliakis, G., Murmann, T., & Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 793, 166-175. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.07.001
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., . . . Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104(1-4), 14-20. doi: 10.1159/000077461
- Ismail, I. H., & Hendzel, M. J. (2008). The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen*, 49(1), 73-82. doi: 10.1002/em.20358
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*, 5, 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514
- Ivashkevich, A., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, R. F., & Martin, O. A. (2012). Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett*, 327(1-2), 123-133. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.025
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, 16(4), 343-353. doi: 10.1038/ni.3123
- Iyama, T., & Wilson, D. M., 3rd. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 12(8), 620-636. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Jaatinen, T., & Laine, J. (2007). Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol, Chapter 2, Unit 2A 1*. doi: 10.1002/9780470151808.sc02a01s1
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687-696.
- Jacobs, J. F., Idema, A. J., Bol, K. F., Grotenhuis, J. A., de Vries, I. J., Wesseling, P., & Adema, G. J. (2010). Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol*, 225(1-2), 195-199. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.020
- Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2007). Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol*, 119(6), 1313-1320. doi: 10.1016/j.jaci.2007.03.043
- Jafarzadeh, A., Sadeghi, M., Karam, G. A., & Vazirinejad, R. (2010). Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz Oral Res*, 24(1), 21-27.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., . . . Scadden, D. T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443(7110), 421-426. doi: 10.1038/nature05159
- Jeggo, P. A., Hafezparast, M., Thompson, A. F., Broughton, B. C., Kaur, G. P., Zdzienicka, M. Z., & Athwal, R. S. (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14), 6423-6427.
- Ji, P., Murata-Hori, M., & Lodish, H. F. (2011). Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol*, 21(7), 409-415. doi: 10.1016/j.tcb.2011.04.003
- Johnson, R. D., & Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*, 19(13), 3398-3407. doi: 10.1093/emboj/19.13.3398
- Jorissen, M., Willems, T., & Van der Schueren, B. (1998). Nasal ciliary beat frequency is age independent. *Laryngoscope*, 108(7), 1042-1047.
- Joy, M. S., La, M., Wang, J., Bridges, A. S., Hu, Y., Hogan, S. L., . . . Falk, R. J. (2012). Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide pharmacokinetics in patients with glomerulonephritis secondary to lupus and small vessel vasculitis. *Br J Clin Pharmacol*, 74(3), 445-455. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04223.x
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*, 19(21), 5720-5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720
- Kachikwu, E. L., Iwamoto, K. S., Liao, Y. P., DeMarco, J. J., Agazaryan, N., Economou, J. S., . . . Schae, D. (2011). Radiation enhances regulatory T cell representation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(4), 1128-1135. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.034

- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., & Shibata, T. (2001). Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem*, 276(37), 35201-35208. doi: 10.1074/jbc.M104938200
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., . . . Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265(5171), 528-530.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 6(8), 1079-1099. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.03.008
- Karam, A., & Leslie, S. (1996). *The evolution of the earth's background radiation level over geologic time* (Vol. 28). 9. international congress of the International Radiation Protection Association.
- Karasuyama, H., Obata, K., Wada, T., Tsujimura, Y., & Mukai, K. (2011). Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy*, 66(9), 1133-1141. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02613.x
- Karran, P., & Bignami, M. (1992). Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res*, 20(12), 2933-2940.
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323. doi: 10.1038/nature03097
- Kato, K., Kuwabara, M., & Kashiwakura, I. (2011). The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *J Radiat Res*, 52(3), 293-299.
- Kato, K., Omori, A., & Kashiwakura, I. (2013). Radiosensitivity of human haematopoietic stem/progenitor cells. *J Radiol Prot*, 33(1), 71-80. doi: 10.1088/0952-4746/33/1/71
- Khalil, H. S., Tummala, H., Chakarov, S., & Zhelev, N. (2012). Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *BioDiscov*. doi: 10.7750/BioDiscovery.2012.1.3
- Kim, S. T., Lim, D. S., Canman, C. E., & Kastan, M. B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem*, 274(53), 37538-37543.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5678-5694. doi: 10.1093/nar/gkn550
- Kita, H. (2011). Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*, 242(1), 161-177. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01026.x
- Klungland, A., & Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J*, 16(11), 3341-3348. doi: 10.1093/emboj/16.11.3341
- Kobayashi, J., Antoccia, A., Tauchi, H., Matsuura, S., & Komatsu, K. (2004). NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 855-861. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.023
- Kollmann, G., Shapiro, B., & Martin, D. (1969). The mechanism of radiation hemolysis in human erythrocytes. *Radiat Res*, 37(3), 551-566.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131(6), 1149-1163. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.035
- Konjevic, G., Schlesinger, B., Cheng, L., Olsen, K. J., Podack, E. R., & Spuzic, I. (1995). Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural killer cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunol Invest*, 24(3), 499-507.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., & Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 362(6417), 245-248. doi: 10.1038/362245a0
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1), 1-13.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M. R., Ligon, K. L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S., & Sharpless, N. E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443(7110), 453-457. doi: 10.1038/nature05092
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 114(9), 1299-1307. doi: 10.1172/JCI22475
- Krokosz, A., & Szveda-Lewandowska, Z. (2006). Induction of transient radioresistance in human erythrocytes. *Radiation Physics and Chemistry*. doi: 10.1016/j.radphyschem.2006.02.004
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., & Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J*, 15(23), 6662-6670.

- Kulkarni, Y. M., Kaushik, V., Azad, N., Wright, C., Rojanasakul, Y., O'Doherty, G., & Iyer, A. K. (2016). Autophagy-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells by a Novel Digitoxin Analog. *J Cell Physiol*, 231(4), 817-828. doi: 10.1002/jcp.25129
- Kushwah, R., & Hu, J. (2011). Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci*, 1(1), 20. doi: 10.1186/2045-3701-1-20
- Lafuente, E. M., van Puijenbroek, A. A., Krause, M., Carman, C. V., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., . . . Boussiotis, V. A. (2004). RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. *Dev Cell*, 7(4), 585-595. doi: 10.1016/j.devcel.2004.07.021
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*, 31(3), 412-424. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.008
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., & Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 273(3), 1794-1801.
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., . . . Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187-195. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D. P., Bagby, G. C., & Pang, Q. (2004). Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem*, 279(40), 41275-41279. doi: 10.1074/jbc.C400297200
- Li, L., Zhao, L., & Zhong, R. (2014). Quantification of DNA interstrand crosslinks induced by ACNU in NIH/3T3 and L1210 cells using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 28(5), 439-447. doi: 10.1002/rcm.6800
- Li, N., Banin, S., Ouyang, H., Li, G. C., Courtois, G., Shiloh, Y., . . . Rotman, G. (2001). ATM is required for I κ B kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 276(12), 8898-8903. doi: 10.1074/jbc.M009809200
- Liang, L., Deng, L., Nguyen, S. C., Zhao, X., Maulion, C. D., Shao, C., & Tischfield, J. A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 36(10), 3297-3310. doi: 10.1093/nar/gkn184
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H., & Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 404(6778), 613-617. doi: 10.1038/35007091
- Lindahl, T., Satoh, M. S., Poirier, G. G., & Klungland, A. (1995). Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci*, 20(10), 405-411.
- Liu, N., Schild, D., Thelen, M. P., & Thompson, L. H. (2002). Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res*, 30(4), 1009-1015.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., . . . Elledge, S. J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 14(12), 1448-1459.
- Liu, Q., Turner, K. M., Alfred Yung, W. K., Chen, K., & Zhang, W. (2014). Role of AKT signaling in DNA repair and clinical response to cancer therapy. *Neuro Oncol*, 16(10), 1313-1323. doi: 10.1093/neuonc/nou058
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153-158. doi: 10.1038/nature18629
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 25(10), 578-585. doi: 10.1016/j.clon.2013.06.007
- Lowndes, N. F., & Toh, G. W. (2005). DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol*, 15(3), R99-R102. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.029
- Lugade, A. A., Moran, J. P., Gerber, S. A., Rose, R. C., Frelinger, J. G., & Lord, E. M. (2005). Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*, 174(12), 7516-7523.
- Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S. H., Dolman, C., . . . Xiang, R. (2006). Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest*, 116(8), 2132-2141. doi: 10.1172/JCI27648

- Lutsiak, M. E., Semnani, R. T., De Pascalis, R., Kashmiri, S. V., Schlom, J., & Sabzevari, H. (2005). Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*, 105(7), 2862-2868. doi: 10.1182/blood-2004-06-2410
- M'Kacher, R., Bennaceur, A., Farace, F., Lauge, A., Plassa, L. F., Wittmer, E., . . . Turhan, A. G. (2003). Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 22(39), 7905-7912. doi: 10.1038/sj.onc.1206826
- Ma, Q., Baldwin, K. T., Renzelli, A. J., McDaniel, A., & Dong, L. (2001). TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(2), 499-506. doi: 10.1006/bbrc.2001.5987
- Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., & Rao, A. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*, 109(6), 719-731.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H. R., & Medema, R. H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, 29(15), 2281-2291. doi: 10.1038/onc.2009.501
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9), 741-752. doi: 10.1038/nrm2239
- Malek, T. R., & Castro, I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*, 33(2), 153-165. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004
- Maloisel, L., Fabre, F., & Gangloff, S. (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Mol Cell Biol*, 28(4), 1373-1382. doi: 10.1128/MCB.01651-07
- Mansour, W. Y., Rhein, T., & Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res*, 38(18), 6065-6077. doi: 10.1093/nar/gkq387
- Manthey, G. M., & Bailis, A. M. (2010). Rad51 inhibits translocation formation by non-conservative homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 5(7), e11889. doi: 10.1371/journal.pone.0011889
- Marechal, A., & Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Res*, 25(1), 9-23. doi: 10.1038/cr.2014.147
- Mariotti, L. G., Pirovano, G., Savage, K. I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K. M., & Schettino, G. (2013). Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PLoS One*, 8(11), e79541. doi: 10.1371/journal.pone.0079541
- Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E., & Petrini, J. H. (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 17(10), 6087-6096.
- Masson, J. Y., Tarsounas, M. C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Shah, R., McIlwraith, M. J., . . . West, S. C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev*, 15(24), 3296-3307. doi: 10.1101/gad.947001
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., & de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol*, 18(6), 3563-3571.
- Matsumoto, Y., & Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, 269(5224), 699-702.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., 3rd, Hurov, K. E., Luo, J., . . . Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316(5828), 1160-1166. doi: 10.1126/science.1140321
- Matthias, M., Sohr, R., Preiss, R., Brockmann, B. (1984) [Bioavailability of cyclophosphamide following oral administration in high doses]. *Onkologie* 7: 48-49
- Mayer-Kuckuk, P., Ullrich, O., Ziegler, M., Grune, T., & Schweiger, M. (1999). Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 259(3), 576-581. doi: 10.1006/bbrc.1999.0824
- Mayer, C., Popanda, O., Zelezny, O., von Brevern, M. C., Bach, A., Bartsch, H., & Schmezer, P. (2002). DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA Repair (Amst)*, 1(3), 237-250.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., & Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16(2), 311-323.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4), a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656

- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*, 4(10), 762-774. doi: 10.1038/nri1457
- Menasche, G., Kliche, S., Bezman, N., & Schraven, B. (2007). Regulation of T-cell antigen receptor-mediated inside-out signaling by cytosolic adapter proteins and Rap1 effector molecules. *Immunol Rev*, 218, 82-91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00543.x
- Menissier-de Murcia, J., Molinete, M., Gradwohl, G., Simonin, F., & de Murcia, G. (1989). Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *J Mol Biol*, 210(1), 229-233.
- Miao, E. A., Leaf, I. A., Treuting, P. M., Mao, D. P., Dors, M., Sarkar, A., . . . Aderem, A. (2010). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*, 11(12), 1136-1142. doi: 10.1038/ni.1960
- Milyavsky, M., Gan, O. I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., . . . Dick, J. E. (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. *Cell Stem Cell*, 7(2), 186-197. doi: 10.1016/j.stem.2010.05.016
- Minai-Fleminger, Y., & Levi-Schaffer, F. (2009). Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res*, 58(10), 631-638. doi: 10.1007/s00011-009-0042-6
- Mitchison, T. J. (2012). The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy. *Mol Biol Cell*, 23(1), 1-6. doi: 10.1091/mbc.E10-04-0335
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*, 711(1-2), 61-72. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005
- Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., . . . Morrison, S. J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), 448-452. doi: 10.1038/nature05091
- Monack, D. M., Bouley, D. M., & Falkow, S. (2004). Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med*, 199(2), 231-241. doi: 10.1084/jem.20031319
- Moon, S. H., Nguyen, T. A., Darlington, Y., Lu, X., & Donehower, L. A. (2010). Dephosphorylation of gamma-H2AX by WIP1: an important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell Cycle*, 9(11), 2092-2096. doi: 10.4161/cc.9.11.11810
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., . . . de Villartay, J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105(2), 177-186.
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Moynahan, M. E., & Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 196-207. doi: 10.1038/nrm2851
- Muslimovic, A., Johansson, P., & Hammarsten, O. (2012). *Measurement of H2AX Phosphorylation as a Marker of Ionizing Radiation Induced Cell Damage*.
- Muslimovic, A., Nystrom, S., Gao, Y., & Hammarsten, O. (2009). Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PLoS One*, 4(6), e5859. doi: 10.1371/journal.pone.0005859
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., & Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*, 172(2), 834-842.
- Naumann, S. C., Roos, W. P., Jost, E., Belohlavek, C., Lennerz, V., Schmidt, C. W., . . . Kaina, B. (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer*, 100(2), 322-333. doi: 10.1038/sj.bjc.6604856
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, 11(12), 823-836. doi: 10.1038/nri3084
- Nelms, B. E., Maser, R. S., MacKay, J. F., Lagally, M. G., & Petrini, J. H. (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*, 280(5363), 590-592.
- Nesic, D., Hsu, Y., & Stebbins, C. E. (2004). Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature*, 429(6990), 429-433. doi: 10.1038/nature02532

- New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., & Kowalczykowski, S. C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*, 391(6665), 407-410. doi: 10.1038/34950
- Nikolova, T., Dvorak, M., Jung, F., Adam, I., Kramer, E., Gerhold-Ay, A., & Kaina, B. (2014). The gammaH2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: comparison of H2AX phosphorylation with cell death response. *Toxicol Sci*, 140(1), 103-117. doi: 10.1093/toxsci/kfu066
- Nishikawa, H., & Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*, 127(4), 759-767. doi: 10.1002/ijc.25429
- Nishikubo, S., Ohara, M., Ueno, Y., Ikura, M., Kurihara, H., Komatsuzawa, H., . . . Sugai, M. (2003). An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J Biol Chem*, 278(50), 50671-50681. doi: 10.1074/jbc.M305062200
- O'Connor, T. R., & Laval, J. (1991). Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun*, 176(3), 1170-1177.
- Ochs, K., & Kaina, B. (2000). Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res*, 60(20), 5815-5824.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., & Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*, 59(13), 3128-3133.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 10(4), 431-442. doi: 10.1038/sj.cdd.4401183
- Oriya, A., Takahashi, K., Inanami, O., Miura, T., Abe, Y., Kuwabara, M., & Kashiwakura, I. (2008). Individual differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *J Radiat Res*, 49(2), 113-121.
- Ouchi, N. B. (2012). Modelling Radiation Health Effects. *Current Topics in Ionizing Radiation Research InTech*. doi: 10.5772/33708
- Palucka, K., Ueno, H., Roberts, L., Fay, J., & Banchereau, J. (2010). Dendritic cells: are they clinically relevant? *Cancer J*, 16(4), 318-324. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eaca83
- Panneerselvam, P., Singh, L. P., Selvarajan, V., Chng, W. J., Ng, S. B., Tan, N. S., . . . Ding, J. L. (2013). T-cell death following immune activation is mediated by mitochondria-localized SARM. *Cell Death Differ*, 20(3), 478-489. doi: 10.1038/cdd.2012.144
- Parham, P. (2005). Influence of KIR diversity on human immunity. *Adv Exp Med Biol*, 560, 47-50. doi: 10.1007/0-387-24180-9_6
- Parihar, A., Eubank, T. D., & Doseff, A. I. (2010). Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun*, 2(3), 204-215. doi: 10.1159/000296507
- Park, B., Yee, C., & Lee, K. M. (2014). The effect of radiation on the immune response to cancers. *Int J Mol Sci*, 15(1), 927-943. doi: 10.3390/ijms15010927
- Park, M. S., Ludwig, D. L., Stigger, E., & Lee, S. H. (1996). Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem*, 271(31), 18996-19000.
- Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J., & Karnitz, L. (2004). DnaJ 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 1009-1014. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.032
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320. doi: 10.1038/nature14191
- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., . . . Iliakis, G. (2013). DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *PLoS One*, 8(3), e59505. doi: 10.1371/journal.pone.0059505
- Paul, W. E., & Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2), 241-251.
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev*, 13(10), 1276-1288.
- Pegg, A. E., Dolan, M. E., & Moschel, R. C. (1995). Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 51, 167-223.
- Peres, S. Y., Marches, O., Daigle, F., Nougayrede, J. P., Herault, F., Tasca, C., . . . Oswald, E. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol*, 24(5), 1095-1107.
- Perlman, S., Becker-Catania, S., & Gatti, R. A. (2003). Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Neurol*, 10(3), 173-182.
- Pickett, C. L., Cottle, D. L., Pesci, E. C., & Bikah, G. (1994). Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect Immun*, 62(3), 1046-1051.

- Pickett, C. L., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Russell, G., Erdem, A. N., & Zeytin, H. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect Immun*, 64(6), 2070-2078.
- Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., & Bonner, W. M. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*, 81(3), 123-129. doi: 10.1139/o03-042
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., . . . Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625-627. doi: 10.1182/blood-2010-01-259028
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M., & Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(20), 3813-3827. doi: 10.1007/s00018-013-1286-4
- Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M., & Althaus, F. R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*, 275(52), 40974-40980. doi: 10.1074/jbc.M006520200
- Plowman, P. N. (1983). The effects of conventionally fractionated, extended portal radiotherapy on the human peripheral blood count. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 9(6), 829-839.
- Podlutzky, A. J., Dianova, I., Wilson, S. H., Bohr, V. A., & Dianov, G. L. (2001). DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry*, 40(3), 809-813.
- Prasad, R., Singhal, R. K., Srivastava, D. K., Molina, J. T., Tomkinson, A. E., & Wilson, S. H. (1996). Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem*, 271(27), 16000-16007.
- Qiang, L., Wu, C., Ming, M., Viollet, B., & He, Y. Y. (2013). Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem*, 288(3), 1603-1611. doi: 10.1074/jbc.M112.415224
- Quezada, S. A., & Peggs, K. S. (2013). Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer*, 108(8), 1560-1565. doi: 10.1038/bjc.2013.117
- Quiros, S., Roos, W. P., & Kaina, B. (2010). Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle*, 9(1), 168-178. doi: 10.4161/cc.9.1.10363
- Radiation exposure: a quick guide to what each level means. The guardian. DataBlog
<https://www.theguardian.com/news/datablog/2011/mar/15/radiation-exposure-levels-guide>
- Read, S., Malmstrom, V., & Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192(2), 295-302.
- Reddy, G., Golub, E. I., & Radding, C. M. (1997). Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutat Res*, 377(1), 53-59.
- Redon, C. E., Dickey, J. S., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2009). gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res*, 43(8), 1171-1178. doi: 10.1016/j.asr.2008.10.011
- Reeves, W. H., & Sthoeger, Z. M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem*, 264(9), 5047-5052.
- Reichert, S., Rodel, C., Mirsch, J., Harter, P. N., Tomicic, M. T., Mittelbronn, M., . . . Rodel, F. (2011). Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol*, 101(1), 51-58. doi: 10.1016/j.radonc.2011.06.037
- Rendic, S., & Guengerich, F. P. (2012). Summary of Information on the Effects of Ionizing and Non-ionizing Radiation on Cytochrome P450 and Other Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Current Drug Metabolism*, 13(6), 787-814.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 269-281. doi: 10.1038/nri3191
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M. J., . . . Lobrich, M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*, 16(5), 715-724. doi: 10.1016/j.molcel.2004.10.029
- Richardson, C., Moynahan, M. E., & Jasin, M. (1998). Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev*, 12(24), 3831-3842.
- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, 26(47), 6715-6723. doi: 10.1038/sj.onc.1210756

- Rodel, F., Frey, B., Gaip, U., Keilholz, L., Fournier, C., Manda, K., . . . Rodel, C. (2012). Modulation of inflammatory immune reactions by low-dose ionizing radiation: molecular mechanisms and clinical application. *Curr Med Chem*, 19(12), 1741-1750.
- Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., . . . Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11(8), 973-979. doi: 10.1038/ncb1909
- Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2011). DNA damage and autophagy. *Mutat Res*, 711(1-2), 158-166. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., & Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146(5), 905-916.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10), 5858-5868.
- Romagne, F., Andre, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., . . . Wagtmann, N. (2009). Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood*, 114(13), 2667-2677. doi: 10.1182/blood-2009-02-206532
- Roos, W. P., Baumgartner, M., & Kaina, B. (2004). Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene*, 23(2), 359-367. doi: 10.1038/sj.onc.1207080
- Roos, W. P., Jost, E., Belohlavek, C., Nagel, G., Fritz, G., & Kaina, B. (2011). Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN-beta and valproic acid. *Cancer Res*, 71(12), 4150-4160. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3498
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 12(9), 440-450. doi: 10.1016/j.molmed.2006.07.007
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*, 332(2), 237-248. doi: 10.1016/j.canlet.2012.01.007
- Roos, W. P., Thomas, A. D., & Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 16(1), 20-33. doi: 10.1038/nrc.2015.2
- Roset, R., Inagaki, A., Hohl, M., Brenet, F., Lafrance-Vanasse, J., Lange, J., . . . Petrini, J. H. (2014). The Rad50 hook domain regulates DNA damage signaling and tumorigenesis. *Genes Dev*, 28(5), 451-462. doi: 10.1101/gad.236745.113
- Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., & Iliakis, G. (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, 36(5), 1610-1623. doi: 10.1093/nar/gkn013
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 24, 147-174. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720
- Rothkamm, K., & Horn, S. (2009). gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45(3), 265-271.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., & Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23(16), 5706-5715.
- Rothkamm, K., & Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5057-5062. doi: 10.1073/pnas.0830918100
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H., & Poirier, G. G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer*, 10(4), 293-301. doi: 10.1038/nrc2812
- Rupnik, A., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2010). MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 119(2), 115-135. doi: 10.1007/s00412-009-0242-4
- Ryan, J. L. (2012). Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 2), 985-993. doi: 10.1038/jid.2011.411
- Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H., & Sekiguchi, M. (1993). Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem*, 268(31), 23524-23530.
- Salati, S., Bianchi, E., Zini, R., Tenedini, E., Quaglino, D., Manfredini, R., & Ferrari, S. (2007). Eosinophils, but not neutrophils, exhibit an efficient DNA repair machinery and high nucleolar activity. *Haematologica*, 92(10), 1311-1318.
- Samson, L., Derfler, B., Boosalis, M., & Call, K. (1991). Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 9127-9131.
- Sanli, T., Steinberg, G. R., Singh, G., & Tsakiridis, T. (2014). AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway. *Cancer Biol Ther*, 15(2), 156-169. doi: 10.4161/cbt.26726

- Savignac, M., Mellstrom, B., & Naranjo, J. R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch*, 454(4), 523-533. doi: 10.1007/s00424-007-0238-y
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., . . . Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218), 1749-1753.
- Scharer, O. D., & Jiricny, J. (2001). Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*, 23(3), 270-281. doi: 10.1002/1521-1878(200103)23:3<270::AID-BIES1037>3.0.CO;2-J
- Schatz, D. G. (2004). V(D)J recombination. *Immunol Rev*, 200, 5-11. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00173.x
- Schild, D., Lio, Y. C., Collins, D. W., Tsomondo, T., & Chen, D. J. (2000). Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem*, 275(22), 16443-16449. doi: 10.1074/jbc.M001473200
- Schipler, A., & Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res*, 41(16), 7589-7605. doi: 10.1093/nar/gkt556
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*, 3, 51. doi: 10.3389/fimmu.2012.00051
- Schwenk, R., Asher, L. V., Chalom, I., Lanar, D., Sun, P., White, K., . . . Krzych, U. (2003). Opsonization by antigen-specific antibodies as a mechanism of protective immunity induced by Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-based vaccine. *Parasite Immunol*, 25(1), 17-25.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 278-287. doi: 10.1038/nrc3236
- Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G., & Bonner, W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*, 158(4), 486-492.
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(6), 640-653. doi: 10.1002/wsbm.86
- Sengupta, S., Marrinan, J., Frishman, C., & Sampath, P. (2012). Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. *Clin Dev Immunol*, 2012, 831090. doi: 10.1155/2012/831090
- Shangary, S., Brown, K. D., Adamson, A. W., Edmonson, S., Ng, B., Pandita, T. K., . . . Baskaran, R. (2000). Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process. *J Biol Chem*, 275(39), 30163-30168. doi: 10.1074/jbc.M004302200
- Sharabi, A., & Haran-Ghera, N. (2011). Immune recovery after cyclophosphamide treatment in multiple myeloma: implication for maintenance immunotherapy. *Bone Marrow Res*, 2011, 269519. doi: 10.1155/2011/269519
- Sharabi, A., Laronne-Bar-On, A., Meshorer, A., & Haran-Ghera, N. (2010). Chemoimmunotherapy reduces the progression of multiple myeloma in a mouse model. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(10), 1265-1276. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0138
- Sharif-Askari, E., Alam, A., Rheume, E., Beresford, P. J., Scotto, C., Sharma, K., . . . Sekaly, R. P. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J*, 20(12), 3101-3113. doi: 10.1093/emboj/20.12.3101
- Shen, Z., Cloud, K. G., Chen, D. J., & Park, M. S. (1996). Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem*, 271(1), 148-152.
- Shenker, B. J., Hoffmaster, R. H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E. T., & Demuth, D. R. (2001). Induction of apoptosis in human T cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *J Immunol*, 167(1), 435-441.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M. M., . . . Tainer, J. A. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell*, 53(1), 7-18. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.003
- Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., & Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, 14(3), 289-300.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3(3), 155-168. doi: 10.1038/nrc1011
- Sica, A., & Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*, 117(5), 1155-1166. doi: 10.1172/JCI31422
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J. S., & Sung, P. (2001). Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev*, 15(24), 3308-3318. doi: 10.1101/gad.935501

- Sipley, J. D., Menninger, J. C., Hartley, K. O., Ward, D. C., Jackson, S. P., & Anderson, C. W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7515-7519.
- Slingluff, C. L., Jr. (2011). The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J*, 17(5), 343-350. doi: 10.1097/PPO.0b013e318233e5b2
- Smart, D. J., Ahmed, K. P., Harvey, J. S., & Lynch, A. M. (2011). Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat Res*, 715(1-2), 25-31. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.07.001
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- Smith, G. C., Cary, R. B., Lakin, N. D., Hann, B. C., Teo, S. H., Chen, D. J., & Jackson, S. P. (1999). Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20), 11134-11139.
- Smith, G. C., & Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*, 13(8), 916-934.
- Smits, V. A., Warmerdam, D. O., Martin, Y., & Freire, R. (2010). Mechanisms of ATR-mediated checkpoint signalling. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 15, 840-853.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., . . . Wilson, S. H. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, 379(6561), 183-186. doi: 10.1038/379183a0
- Sohn, D., Graupner, V., Neise, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., & Janicke, R. U. (2009). Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ*, 16(6), 869-878. doi: 10.1038/cdd.2009.17
- Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C., & Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8388-8394. doi: 10.1073/pnas.111006398
- Srivastava, D. K., Berg, B. J., Prasad, R., Molina, J. T., Beard, W. A., Tomkinson, A. E., & Wilson, S. H. (1998). Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem*, 273(33), 21203-21209.
- Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., . . . Egelman, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol*, 10(6), 337-340.
- Steinbach, K. H., Schick, P., Trepel, F., Raffler, H., Dohrmann, J., Heilgeist, G., . . . Begemann, H. (1979). Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut*, 39(1), 27-38.
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M., & Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926), 961-966. doi: 10.1038/nature01446
- Stucki, M., & Jackson, S. P. (2004). MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 953-957. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.007
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hubscher, U., & Dogliotti, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, 17(7), 835-843. doi: 10.1038/sj.onc.1202001
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352(10), 987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Su, L., Quade, B., Wang, H., Sun, L., Wang, X., & Rizo, J. (2014). A plug release mechanism for membrane permeation by MLKL. *Structure*, 22(10), 1489-1500. doi: 10.1016/j.str.2014.07.014
- Sugai, M., Kawamoto, T., Peres, S. Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., . . . Oswald, E. (1998). The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun*, 66(10), 5008-5019.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., . . . Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.031
- Suto, Y., Gotoh, T., Noda, T., Akiyama, M., Owaki, M., Darroudi, F., & Hirai, M. (2015). Assessing the applicability of FISH-based prematurely condensed dicentric chromosome assay in triage biodosimetry. *Health Phys*, 108(3), 371-376. doi: 10.1097/HP.0000000000000182
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, 20(21), 5971-5981. doi: 10.1093/emboj/20.21.5971
- Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., & Remington, J. S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851), 516-518.

- Svensson, L. A., Tarkowski, A., Thelestam, M., & Lagergard, T. (2001). The impact of *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin on cells involved in immune response. *Microb Pathog*, 30(3), 157-166. doi: 10.1006/mpat.2000.0422
- Svensson, L. M., Jemth, A. S., Desroses, M., Loseva, O., Helleday, T., Hogbom, M., & Stenmark, P. (2011). Crystal structure of human MTH1 and the 8-oxo-dGMP product complex. *FEBS Lett*, 585(16), 2617-2621. doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.017
- Tacken, P. J., de Vries, I. J., Torensma, R., & Figdor, C. G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol*, 7(10), 790-802. doi: 10.1038/nri2173
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Fukushima, T., Morrison, C., Albala, J. S., . . . Takeda, S. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol*, 20(17), 6476-6482.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., . . . Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, 17(18), 5497-5508. doi: 10.1093/emboj/17.18.5497
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17(1), 1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186
- Tan, J. K., & O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol*, 78(2), 319-324. doi: 10.1189/jlb.1104664
- Taylor, A. M., Metcalfe, J. A., Thick, J., & Mak, Y. F. (1996). Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*, 87(2), 423-438.
- Tedesco, F. (2008). Inherited complement deficiencies and bacterial infections. *Vaccine*, 26 Suppl 8, I3-8.
- Theilgaard-Monch, K., Jacobsen, L. C., Borup, R., Rasmussen, T., Bjerregaard, M. D., Nielsen, F. C., . . . Borregaard, N. (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*, 105(4), 1785-1796. doi: 10.1182/blood-2004-08-3346
- Thomas, A. A., Ernstoff, M. S., & Fadul, C. E. (2012). Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J*, 18(1), 59-68. doi: 10.1097/PPO.0b013e3182431a73
- Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X., & Ley, T. J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*, 12(6), 621-632.
- Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2), 287-296.
- Tindle, R. W., Nichols, R. A., Chan, L., Campana, D., Catovsky, D., & Birnie, G. D. (1985). A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res*, 9(1), 1-9.
- Tomkinson, A. E., Chen, L., Dong, Z., Leppard, J. B., Levin, D. S., Mackey, Z. B., & Motycka, T. A. (2001). Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 68, 151-164.
- Topfer, K., Kempe, S., Muller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M., . . . Temme, A. (2011). Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 918471. doi: 10.1155/2011/918471
- Toulany, M., Kehlbach, R., Florczak, U., Sak, A., Wang, S., Chen, J., . . . Rodemann, H. P. (2008). Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther*, 7(7), 1772-1781. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2200
- Trivedi, S. G., & Lloyd, C. M. (2007). Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci*, 64(10), 1269-1289. doi: 10.1007/s00018-007-6527-y
- Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., & Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem*, 273(34), 21447-21450.
- Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., Hass, R., Grune, T., & Davies, K. J. (1999). Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6223-6228.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., . . . Haupt, Y. (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*, 18(7), 1805-1814. doi: 10.1093/emboj/18.7.1805
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., & Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*, 22(20), 5612-5621. doi: 10.1093/emboj/cdg541

- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27, 693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10), 757-765. doi: 10.1038/nrm1737
- Van Dyck, E., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., & West, S. C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature*, 398(6729), 728-731. doi: 10.1038/19560
- van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 128(3), 415-435.
- van Furth, R., Raeburn, J. A., & van Zwet, T. L. (1979). Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood*, 54(2), 485-500.
- Van Gool, S., Maes, W., Ardon, H., Verschuere, T., Van Cauter, S., & De Vleeschouwer, S. (2009). Dendritic cell therapy of high-grade gliomas. *Brain Pathol*, 19(4), 694-712. doi: 10.1111/j.1750-3639.2009.00316.x
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., & Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*, 3(115), re4. doi: 10.1126/scisignal.3115re4
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10), 700-714. doi: 10.1038/nrm2970
- Vandyke, K., Fitter, S., & Zannettino, A. C. (2011). The tyrosine kinase inhibitor dasatinib (SPRYCEL) inhibits chondrocyte activity and proliferation. *Blood Cancer J*, 1(2), e2. doi: 10.1038/bcj.2011.1
- Vanneman, M., & Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 237-251. doi: 10.1038/nrc3237
- Vauleon, E., Avril, T., Collet, B., Mosser, J., & Quillien, V. (2010). Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol*, 2010. doi: 10.1155/2010/689171
- Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., . . . Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 187(9), 1477-1485.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-271. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Vignali, D. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 523-532. doi: 10.1038/nri2343
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510. doi: 10.1038/ni1582
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., & Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*, 126(1), 111-117. doi: 10.1016/j.mad.2004.09.034
- Vral, A., Thierens, H., Bryant, P., & De Ridder, L. (2001). A higher micronucleus yield in B-versus T-cells after low-dose gamma-irradiation is not linked with defective Ku86 protein. *Int J Radiat Biol*, 77(3), 329-339.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., & Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, 8(8), 607-618. doi: 10.1038/nri2368
- Wainwright, D. A., Sengupta, S., Han, Y., & Lesniak, M. S. (2011). Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro Oncol*, 13(12), 1308-1323. doi: 10.1093/neuonc/nor134
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., . . . Singh-Jasuja, H. (2012). Muropeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*, 18(8), 1254-1261. doi: 10.1038/nm.2883
- Wang, C. W., & Klionsky, D. J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*, 9(3-4), 65-76.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., & Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, 65(10), 4020-4030. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3055
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1), 36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36
- Wang, Y., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*, 218(2), 193-202. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.03.020
- Waring, P., & Mullbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol*, 77(4), 312-317. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x

- Warren, J. J., Forsberg, L. J., & Beese, L. S. (2006). The structural basis for the mutagenicity of O(6)-methyl-guanine lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(52), 19701-19706. doi: 10.1073/pnas.0609580103
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24(6), 677-688. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002
- Weinberg, R. A., & Ludwig, D. K. *CST Guide: Pathways and Protocols* (1th ed.): Cell Signaling Technology.
- Weiskopf, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2009). The aging of the immune system. *Transpl Int*, 22(11), 1041-1050. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x
- Weng, M. W., Zheng, Y., Jasti, V. P., Champeil, E., Tomasz, M., Wang, Y., . . . Tang, M. S. (2010). Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Res*, 38(20), 6976-6984. doi: 10.1093/nar/gkq576
- Wiebauer, K., & Jiricny, J. (1990). Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), 5842-5845.
- Wiese, C., Collins, D. W., Albala, J. S., Thompson, L. H., Kronenberg, A., & Schild, D. (2002). Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res*, 30(4), 1001-1008.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., & Gordon, S. (1996). Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*, 76(4), 927-947.
- Wilson, D. M., 3rd, & Barsky, D. (2001). The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res*, 485(4), 283-307.
- Winzler, C., Fantinato, M., Giordan, M., Calore, E., Basso, G., & Messina, C. (2011). CD4(+) T regulatory cells are more resistant to DNA damage compared to CD4(+) T effector cells as revealed by flow cytometric analysis. *Cytometry A*, 79(11), 903-911. doi: 10.1002/cyto.a.21132
- Wising, C., Azem, J., Zetterberg, M., Svensson, L. A., Ahlman, K., & Lagergard, T. (2005). Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. *Toxicon*, 45(6), 767-776. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.01.016
- Wittmann, C., Chockley, P., Singh, S. K., Pase, L., Lieschke, G. J., & Grabher, C. (2012). Hydrogen peroxide in inflammation: messenger, guide, and assassin. *Adv Hematol*, 2012, 541471. doi: 10.1155/2012/541471
- Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), 814-818. doi: 10.1038/nsmb.1640
- Xu, B., O'Donnell, A. H., Kim, S. T., & Kastan, M. B. (2002). Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res*, 62(16), 4588-4591.
- Xu, T., Lundqvist, A., Ahmed, H. J., Eriksson, K., Yang, Y., & Lagergard, T. (2004). Interactions of Haemophilus ducreyi and purified cytolethal distending toxin with human monocyte-derived dendritic cells, macrophages and CD4+ T cells. *Microbes Infect*, 6(13), 1171-1181. doi: 10.1016/j.micinf.2004.07.003
- Yamada, M., & Wang, Z. L. (2007). 137Cs in the western South Pacific Ocean. *Sci Total Environ*, 382(2-3), 342-350. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.04.039
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., & Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 23(1), 33-42.
- Yamanaka, R. (2008). Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol Med*, 14(5), 228-235. doi: 10.1016/j.molmed.2008.03.003
- Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., . . . Alt, F. W. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, 449(7161), 478-482. doi: 10.1038/nature06020
- Yang, Y. P., Liang, Z. Q., Gu, Z. L., & Qin, Z. H. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*, 26(12), 1421-1434. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00235.x
- Yarilin, A. A., Belyakov, I. M., Kusmenok, O. I., Arshinov, V. Y., Simonova, A. V., Nadezhina, N. M., & Gnezditskaya, E. V. (1993). Late T cell deficiency in victims of the Chernobyl radiation accident: possible mechanisms of induction. *Int J Radiat Biol*, 63(4), 519-528.
- You, Z., & Bailis, J. M. (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol*, 20(7), 402-409. doi: 10.1016/j.tcb.2010.04.002
- Yousefi, S., Gold, J. A., Andina, N., Lee, J. J., Kelly, A. M., Kozlowski, E., . . . Simon, H. U. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*, 14(9), 949-953. doi: 10.1038/nm.1855

- Yung, W. K., Prados, M. D., Yaya-Tur, R., Rosenfeld, S. S., Brada, M., Friedman, H. S., . . . Levin, V. A. (1999). Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. *J Clin Oncol*, 17(9), 2762-2771. doi: 10.1200/jco.1999.17.9.2762
- Zahnreich, S., Ebersberger, A., Kaina, B., & Schmidberger, H. (2015). Biodosimetry Based on gamma-H2AX Quantification and Cytogenetics after Partial- and Total-Body Irradiation during Fractionated Radiotherapy. *Radiat Res*, 183(4), 432-446. doi: 10.1667/RR13911.1
- Zaire, R., Griffin, C. S., Simpson, P. J., Papworth, D. G., Savage, J. R., Armstrong, S., & Hulten, M. A. (1996). Analysis of lymphocytes from uranium mineworkers in Namibia for chromosomal damage using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mutat Res*, 371(1-2), 109-113.
- Zamai, L., Del Zotto, G., Buccella, F., Galeotti, L., Canonico, B., Luchetti, F., & Papa, S. (2012). Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56(bright) NK cells differentiated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitors. *Cytometry A*, 81(4), 294-302. doi: 10.1002/cyto.a.22025
- Zdrojewicz, Z., & Strzelczyk, J. J. (2006). Radon treatment controversy. *Dose Response*, 4(2), 106-118. doi: 10.2203/dose-response.05-025.Zdrojewicz
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., & Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*, 92(1), 83-92.
- Zhang, Y., & Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 18(1), 80-84. doi: 10.1038/nsmb.1940
- Zhang, Y., Wallace, D. L., de Lara, C. M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., . . . Macallan, D. C. (2007). In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*, 121(2), 258-265. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02573.x
- Zhao, D. M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J., & Shevach, E. M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 107(10), 3925-3932. doi: 10.1182/blood-2005-11-4502
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z. G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(14), 5322-5327. doi: 10.1073/pnas.1200012109
- Zhao, S., Weng, Y. C., Yuan, S. S., Lin, Y. T., Hsu, H. C., Lin, S. C., . . . Lee, E. Y. (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*, 405(6785), 473-477. doi: 10.1038/35013083
- Zhu, C., Mills, K. D., Ferguson, D. O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., . . . Alt, F. W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell*, 109(7), 811-821.
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154
- Zola, H., Swart, B., Nicholson, I., Aasted, B., Bensussan, A., Boumsell, L., . . . Warren, H. (2005). CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*, 106(9), 3123-3126. doi: 10.1182/blood-2005-03-1338

6 Anhang

6.1

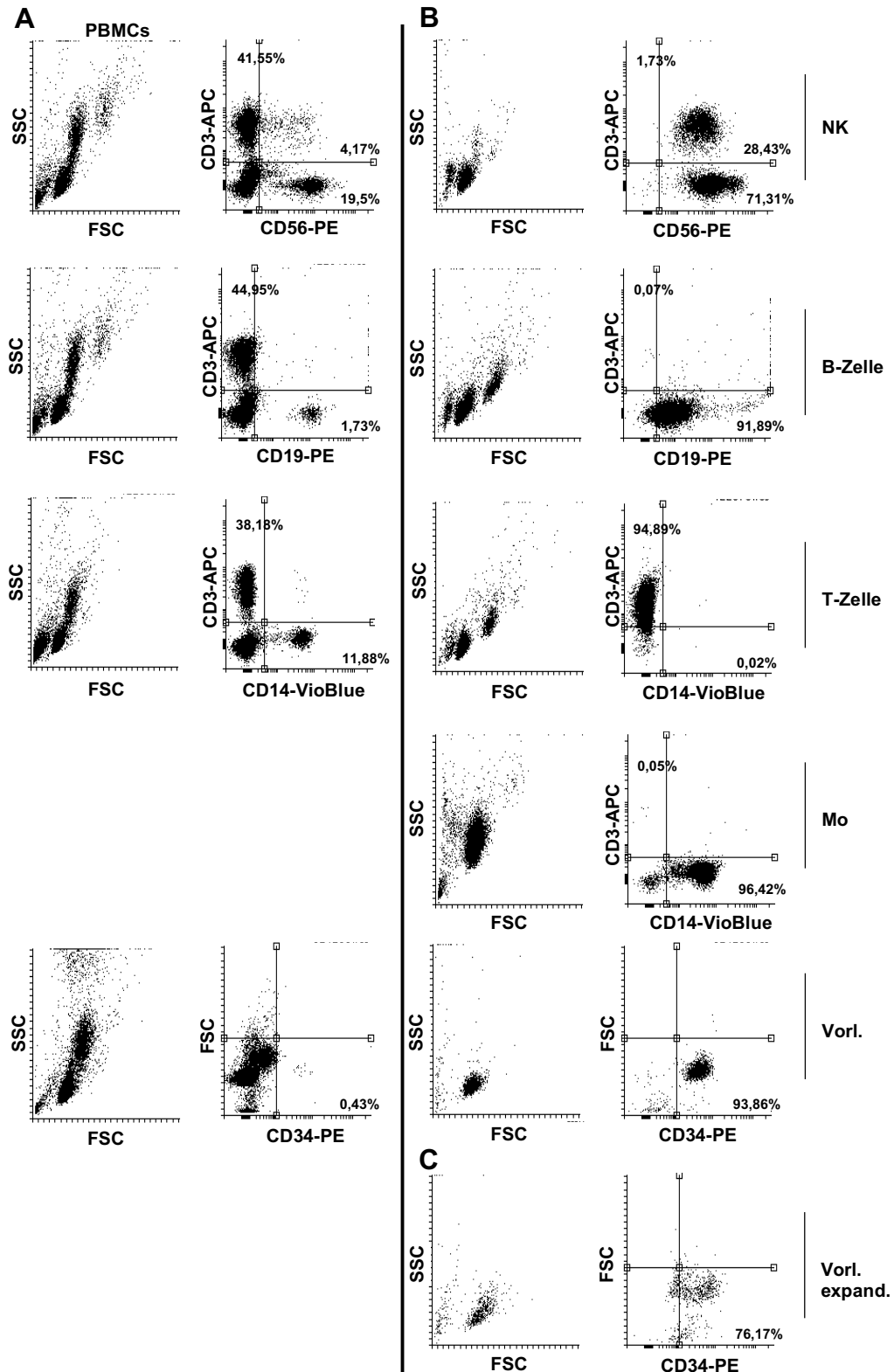


Abb. 6.1: Isolation von CD56+ NK-Zellen, CD19+ B-Zellen, CD3+ T-Zellen, CD14+ Monozyten und CD34+ Vorläuferzellen mithilfe magnetischer Beads. CD3-APC, CD56-PE, CD19-PE, CD14-VioBlue und CD34-PE gefärbte PBMCs direkt vor (A) und nach *Bead*-Isolation (B). Eine Anreicherung der Zellen (CD56/CD19/CD3/CD14/CD34) ist zu über 90 % Reinheit möglich C: Die in B angereicherten CD34 Vorläuferzellen wurden 6 Tage mit entsprechendem Expansionsmedium kultiviert und mit CD34-PE angefärbt. Die Zellen behalten ihren CD34-positiven Phänotyp.

6.2

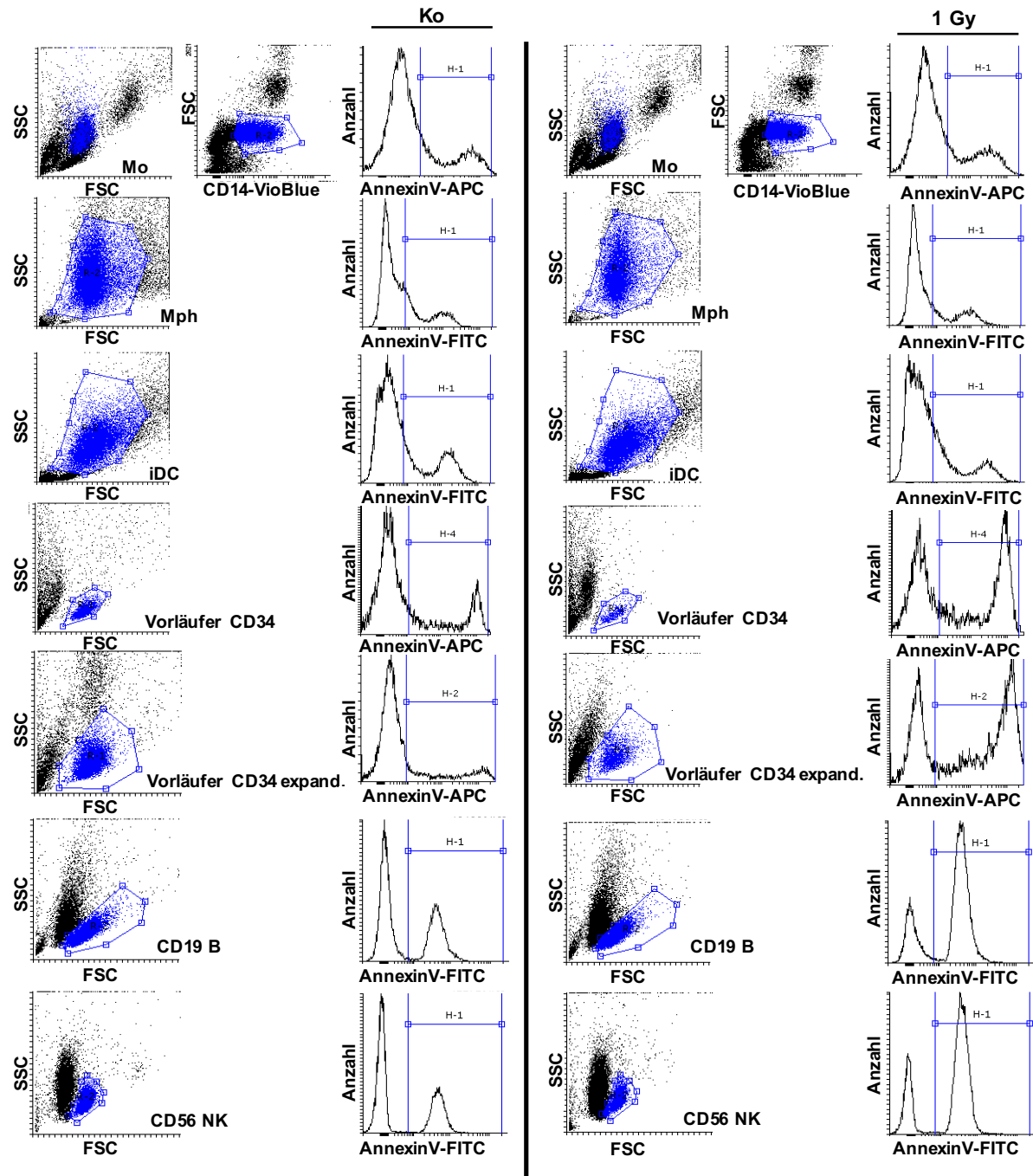


Abb. 6.2: SSC/FSC-Dotblots von aufgereinigten Zellen und Histogramme der AnnexinV-Färbung in unbehandelten (Ko) und 1 Gy exponierten Zellen nach 24 h. Gating im SSC/FSC zeigt nicht-fragmentierte Zellen für Abb. 3.2. Sterbende Zellen verschieben sich im SSC/FSC-Dotplot nach links (fragmentierte Zellen).

6.3

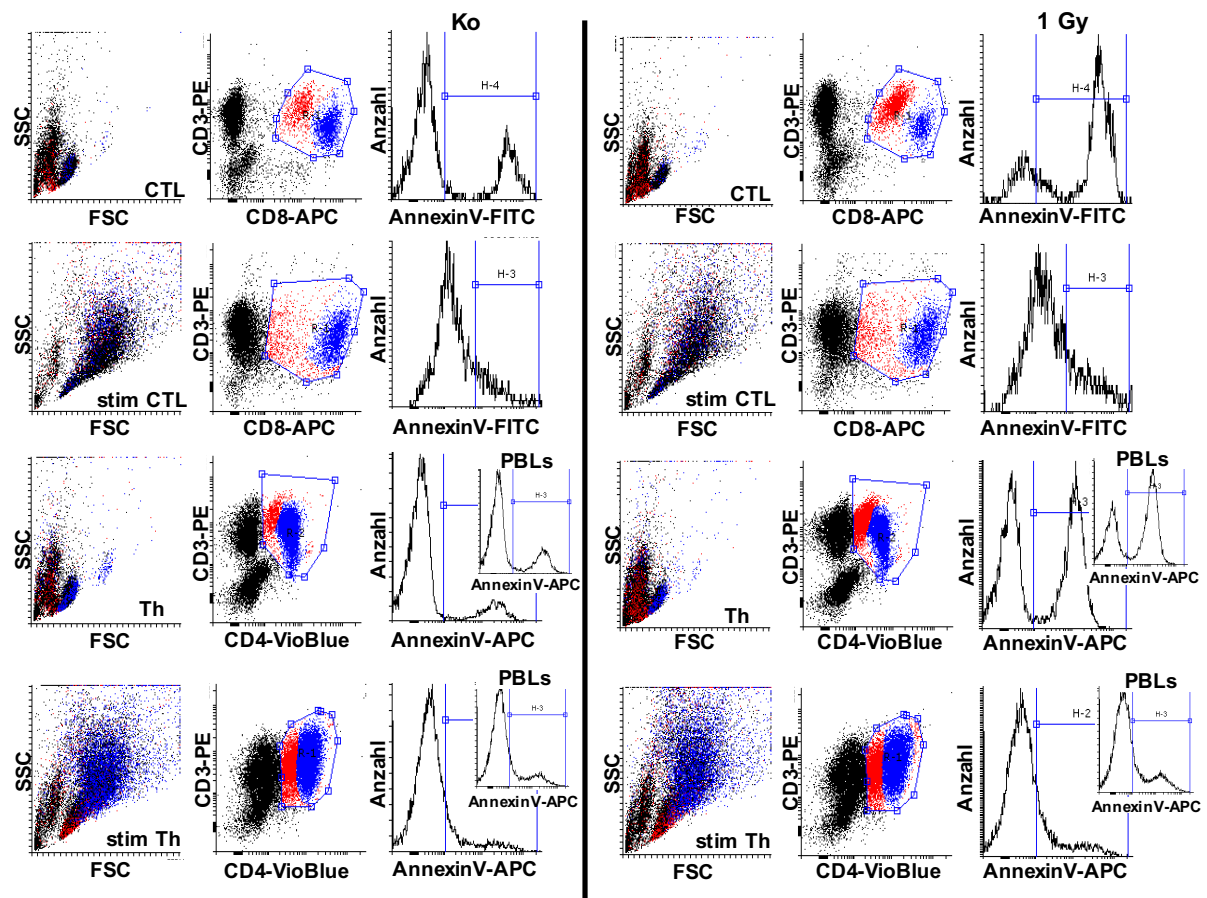


Abb. 6.3: SSC/FSC-*Dotblots* unstimulierter und stimulierter Lymphozyten (PBLs) sowie Histogramme der AnnexinV-Färbungen in unbehandelten (Ko) und 1 Gy exponierten Zellen nach 24 h. Innerhalb der PBLs wurden CD3+/CD8+ CTL bzw. CD3+/CD4+ Th markiert. Sterbende Zellen verschieben sich im *Dotplot* nach links (von blau nach rot) bzw. verlieren ihre Positivität für CD8 bzw. CD4. Der Verlust des CD8- bzw. CD4-Markers (von blau nach rot) wird als Fragmentierung von Th und CTL aufgrund der Bestrahlung gedeutet und ist in Abb. 3.2 dargestellt. Histogramme zeigen AnnexinV-Färbungen innerhalb des Gates zur Markierung von Th bzw. CTL oder in der kompletten PBL-Fraktion. Stimulierte Zellen zeigen nach 1 Gy ein deutlich geringeres AnnexinV-Signal als unstimulierte Zellen.

6.4

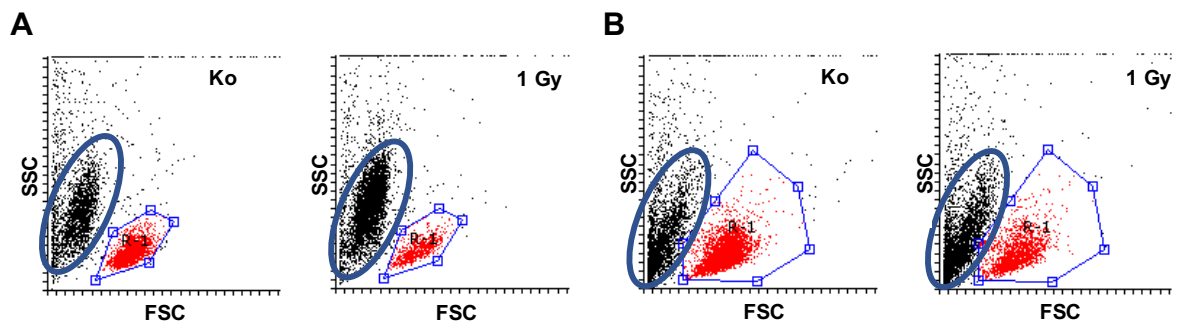


Abb. 6.4: Abnahme der rechten (roten) Population mit Verschiebung nach links als Folge der Zelltodinduktion bzw. Zellfragmentierung (Kreis) in unbehandelten (Ko) und behandelten (1 Gy) CD34+ Vorläuferzellen (A, nicht-expandede; B, expandierte CD34+ Zellen).

6.5

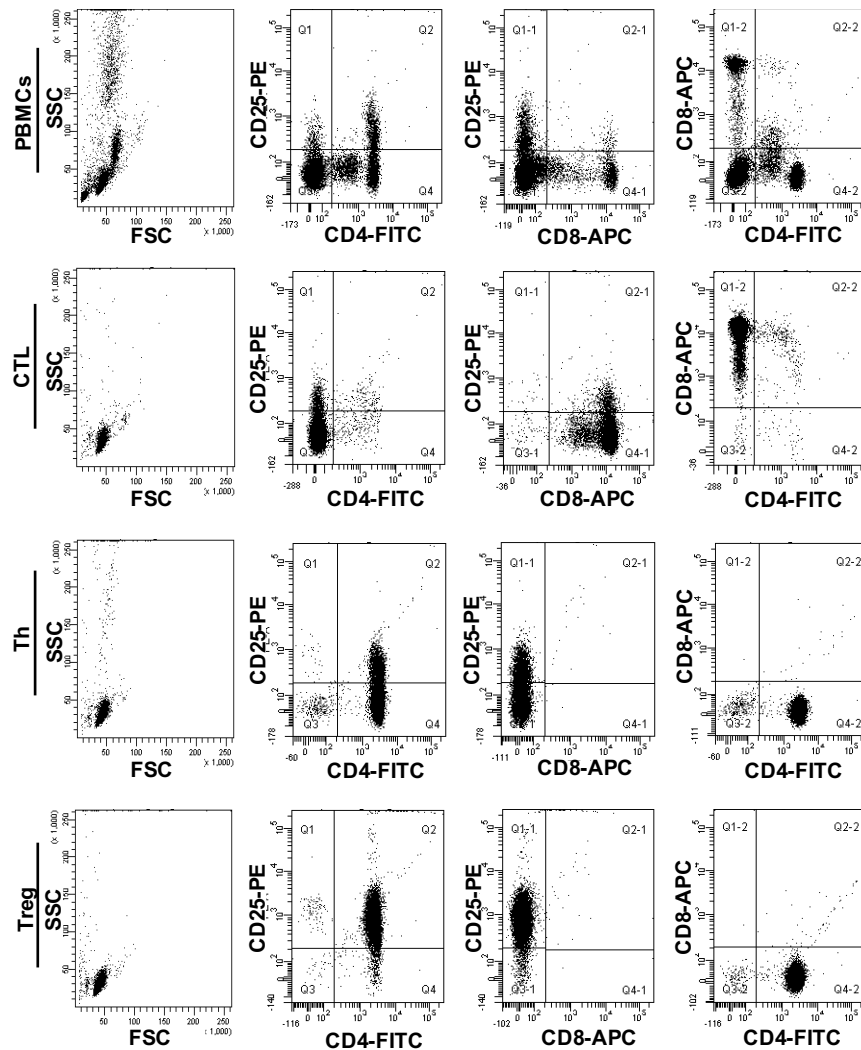


Abb. 6.5: Anteil CD4/CD8/CD25-positiver Zellen nach Ficoll (PBMCs) und nach Isolation mit magnetischen Beads für CTL (CD8), Th (CD4) und Treg (CD4 und CD25).

6.6

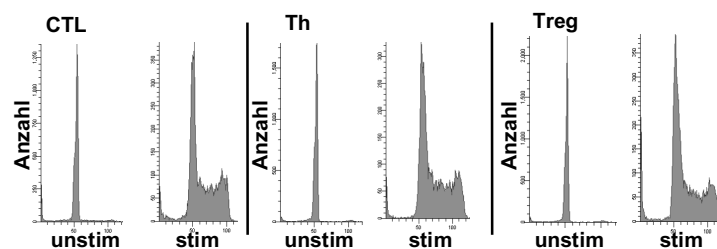


Abb. 6.6: Aufgereinigte Treg, Th und CTL 4 Tage unstimuliert bzw. stimuliert mit Antikörper gegen CD3 und CD28. Färbung mit PI für Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer.

6.7

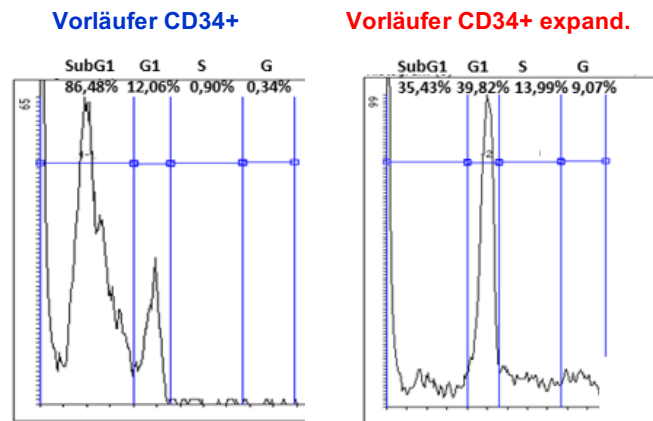


Abb. 6.7: PI-Färbung (SubG1-Assay) von isolierten CD34+ Vorläuferzellen, 3 Tage kultiviert in Medium ohne und mit Zytokinzusatz (expand.). Ohne Zytokine zeigen CD34+ Vorläuferzellen nach 3 Tagen basal stark erhöhte Werte der SubG1-Fraktion und Zellen in G1. Aufgrund der erhöhten basalen Zelltodwerte, die sich im Laufe der Kultivierung einstellen, wurden nicht-expandierte CD34+ Vorläuferzellen immer am Tag der Isolation bestrahlt und nach 24 h der Zelltod gemessen. Eine Expansion der CD34+ Vorläuferzellen mit Zytokinen führt zur Proliferation der Zellen mit Anstieg der S- und G2-Phase Population.

6.8

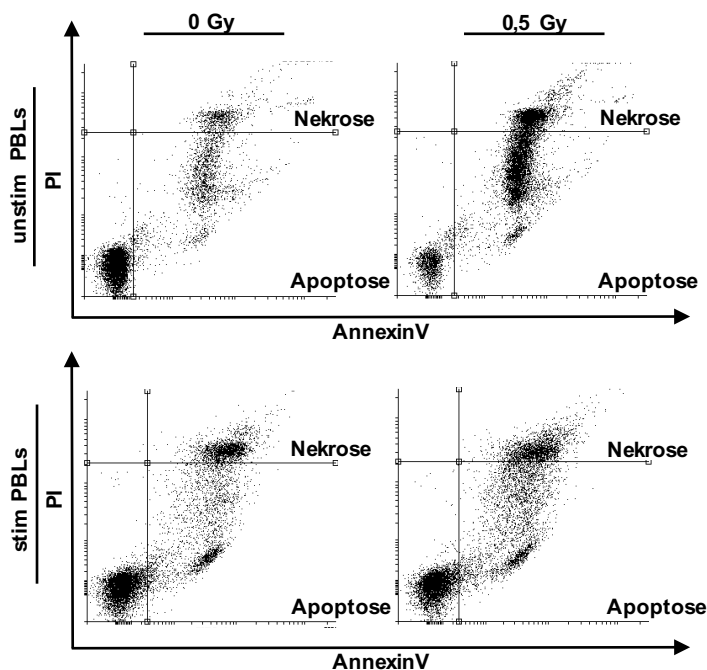


Abb. 6.8: Apoptose- und Nekrose-Gating am Durchflusszytometer von AnnexinV/PI-gefärbten unstimulierten und CD3-/CD28-stimulierten Lymphozyten (PBLs), 24 h nach Exposition mit 0,5 Gy bzw. unbehandelt (0 Gy).

6.9

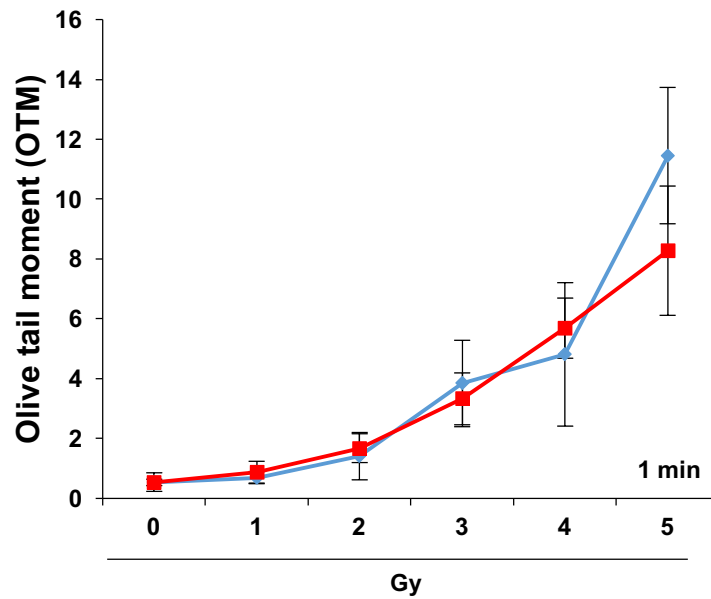


Abb. 6.9: DNA-Einzelstrangbrüche gemessen mittels Alkalischem *Comet Assay* in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten 1 min nach unterschiedlichen Dosen IR. PBLs wurden nach Exposition mit IR nach 1 min sofort auf Eis gelagert, um die Reparatur der Zellen zu verlangsamen, und für den *Comet Assay* vorbereitet.

6.10

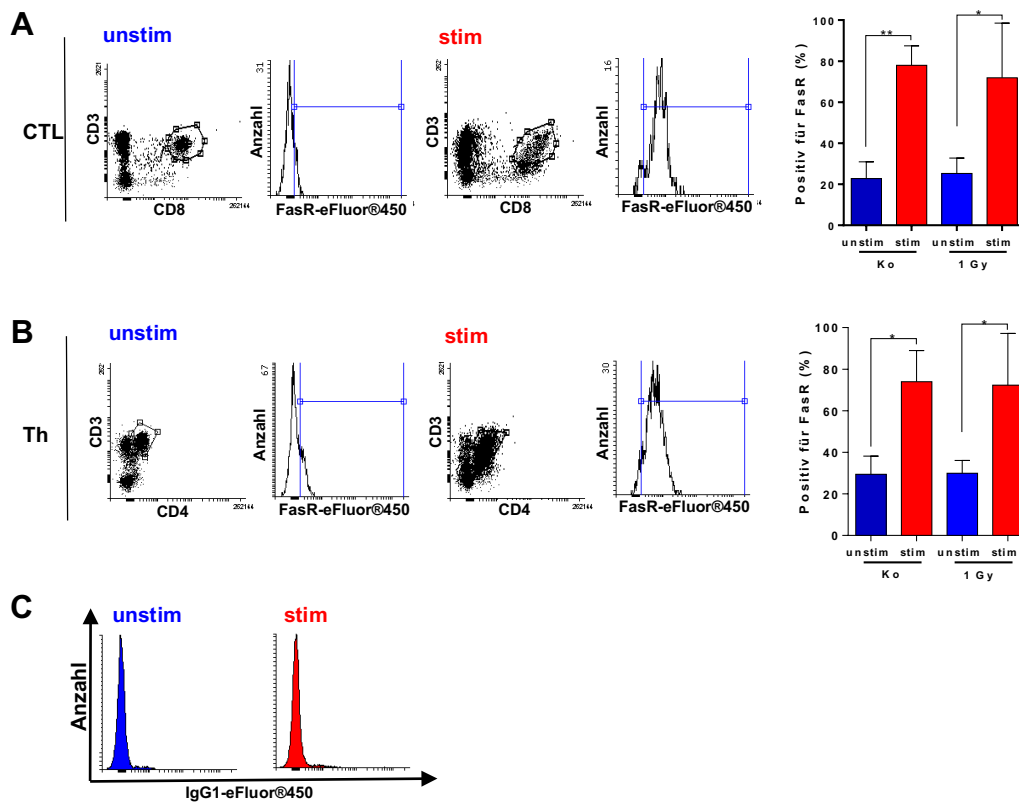


Abb. 6.10: Analyse der FasR-Expression mittels eFluor@450-gekoppelter Antikörper gegen FasR (CD95) auf A: CTLs und B: Th *gated* innerhalb unstimulierter und stimulierter Lymphozyten (PBLs). Repräsentative *Dotblots* und Histogramme von Lymphozyten exponiert mit 1 Gy (links), Quantifizierung $\pm$ 1 Gy exponierter Lymphozyten (rechts). t-Test, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Mittelwert, SD, $n = 3$. C: Färbung mit Isotypenkontrolle IgG1-eFluor@450 zeigt kein Signal. Eine unspezifische Bindung des AK kann somit ausgeschlossen werden.

6.11

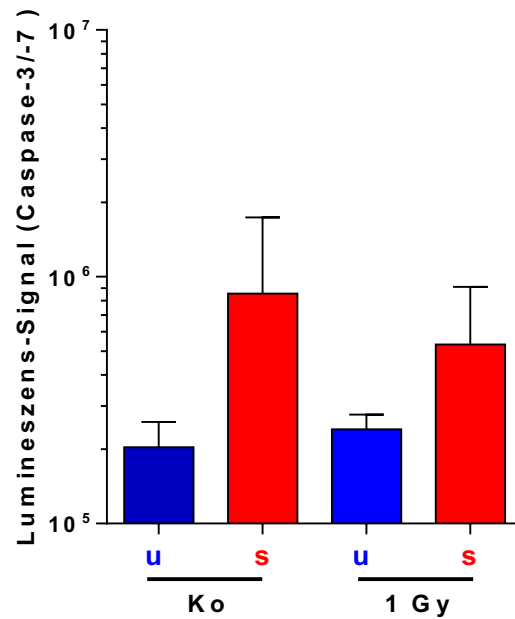


Abb. 6.11: Analyse der Caspase-3/7-Aktivität mittels Lumineszenz-Assay in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs), unbehandelt (Ko) oder 24 h nach 1 Gy. Mittelwert, SD, n = 3. Logarithmische Skala.

6.12

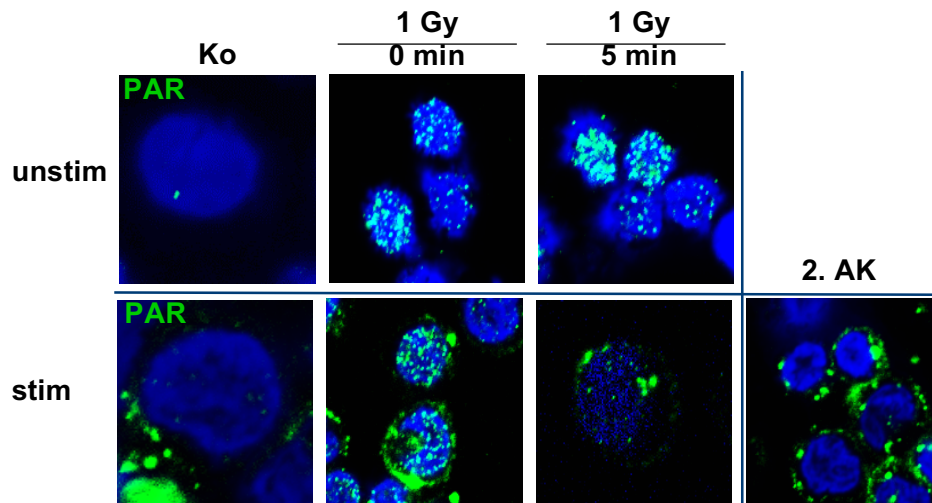


Abb. 6.12: Immunhistochemische Färbung von PAR zur Bestimmung der PARP-Aktivität in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (PBLs) nach 1 Gy IR. Eine Induktion von PAR ist direkt nach 1 Gy in beiden Populationen sichtbar. Nach 5 min ist ein stärkeres PAR-Signal in unstimulierten PBLs zu erkennen. Extranukleäres PAR-Signal in stimulierten Lymphozyten kann auf eine unspezifische Bindung des 2. AK an der Zelloberfläche zurückgeführt werden (siehe Bild zur Färbung nur mit 2. AK). Kern, blau; PAR, grün. n = 1.

6.13

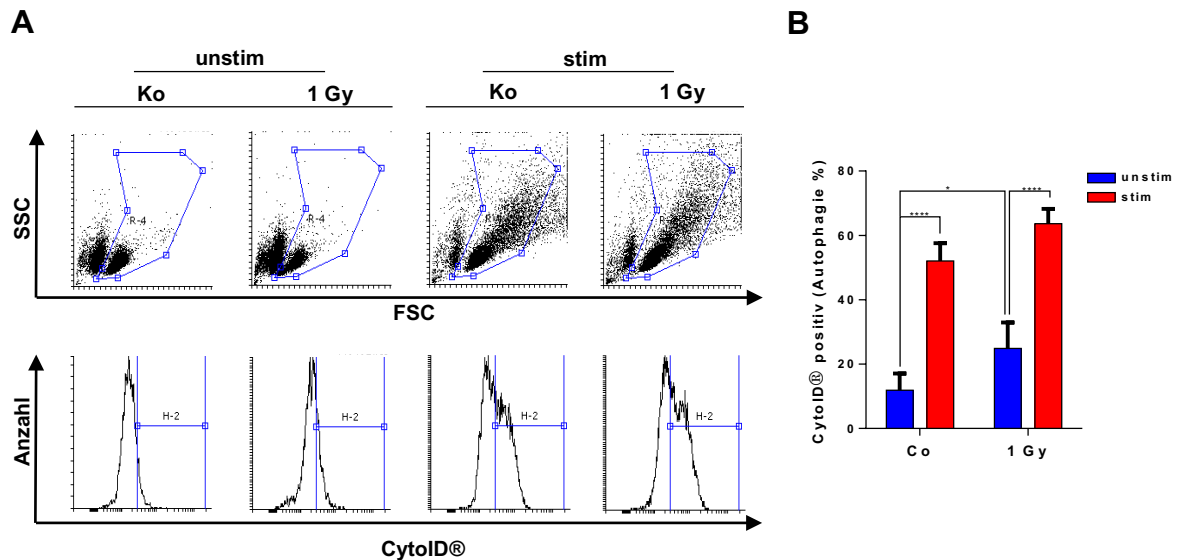


Abb. 6.13: CytolD® - Färbung von Lymphozyten zur Messung der Autophagie am Durchflusszytometer.

A: Repräsentative *Dotblots* bzw. Histogramme. *Gating* der Lebendfraktion am SSC/FSC (oben) und Analyse dieser Zellen im Histogramm (unten). Ein Verschieben des Signals nach rechts bedeutet ein Anstieg der autophagischen Zellpopulation. **B:** Quantifizierung CytolD®-positiver Zellen. IR induziert leicht Autophagie in unstimulierten wie auch stimulierten Lymphozyten. Höhere CytolD®-Signale werden in stimulierten Lymphozyten gemessen. Weitere Versuche zur Charakterisierung der Autophagie wie z.B. in Form einer Anreicherung von LC-3B sowie Positivkontrollen stehen aus. Mittelwert, SD, n = 4. *Two-Way ANOVA*, *p < 0,05, ****p < 0,0001.

6.14

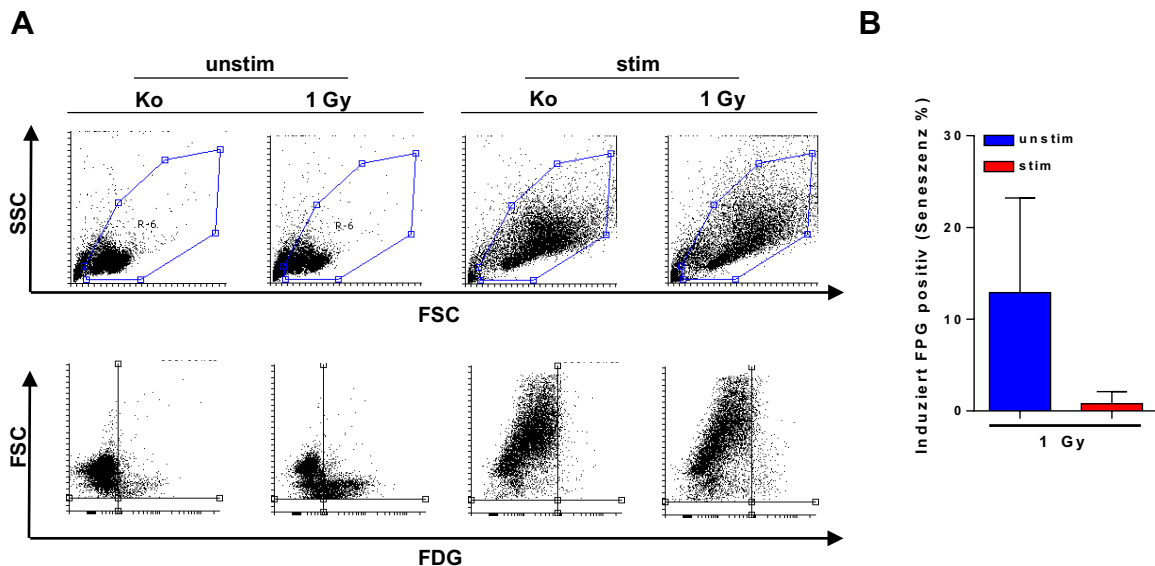


Abb. 6.14: FDG-Färbung von Lymphozyten zur Messung der Seneszenz am Durchflusszytometer.

A: Repräsentative *Dotblots* bzw. Histogramme. *Gating* der Lebend- und Todfraktion am SSC/FSC (oben) und Analyse dieser Zellen im Histogramm (unten). Ein Verschieben des Signals nach rechts bedeutet ein Anstieg der seneszenten Zellpopulation. Unbehandelte, stimulierte Zellen (Ko) zeigen eine hohe FDG-Autofluoreszenz. **B:** Quantifizierung der Induktion FDG-positiver Zellen nach 1 Gy. Mittelwert, SD, n = 3.

6.17

GEN	ANTISENSE (LOW)	SENSE (UP)
<i>SURVIVIN*</i>	ATGACTTGTGTGTGATGA	GTTTGTGCTATTCTGTGAA
<i>POLQ</i>	GCAATATCCAATGAAGAGA	ATACTACCTCCAFaftCT
<i>PCNA</i>	AGTGTCAACGTTGAAGAG	TTACCATAGAGATGAATGAACCA
<i>BRCA1</i>	CAGTTCCAAGGTTAGAGA	AAGACTTCTACAGAGTGAA
<i>FEN1</i>	AACAGCAATCAGGAAGCTG	CGGGAGAATGACATCAAG
<i>RAD51*</i>	GGGGTGATCAGTTTCTGTGTC	GCACAATCATCTGCAAGTGGG
<i>TRP73</i>	ATCTGGCAGTAGAGTTTC	CACTTTGAGGTCACTTTC
<i>BRCA2*</i>	CTACACCACCCACCTTA	CATGACTTGACAGCTTCTCT
<i>KU70</i>	AACTATCTCTCTGAATA	TGGGAGTCATATTACAAA
<i>BCL2</i>	TCTACTTCCTCTGTGATGT	CGACTCCTGATTCAATGG
<i>FANCD2</i>	GGCTGTTACGGAATGAAGA	AGTTGGTGATGGATAAGTTGT
<i>CHK1</i>	TAAATCACAATCGCCACTC	CCACCTCTTCATAACAACAA
<i>MLH1</i>	CTGAATACCTGCCAACAA	TTACAACATAGCCACGAG
<i>MGMT*</i>	AATCACTCCGAATTTCAC	CTCTTCACCATCCCGTTT
<i>MSH2*</i>	CTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGA	ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT
<i>MTH1</i>	AAACCAGTAGCTGTCTGCTG	CGAAATGCGCCCATGCTG
<i>PARP1</i>	CACTTGCTGCTTGTGTGAA	GAACGACCTGATCTGGAA
<i>ATG3</i>	TTCCAACAATCCACTCTC	AGGACAATATAAGGCTCAA
<i>DNAPKcs</i>	GGATTTCTTCTCTACATTAC	GCATTACAGACATCTTAGTT
<i>MSH6*</i>	GAAATTTAAGCCAGACACTAA	CCTTCACTCTCACTATCC
<i>FASR</i>	GGCTTCATTGACACCATT	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA
<i>TRP53</i>	ACGGATCTGAAGGGTGAAA	AGCCTAAGCGAGCATG
<i>AKT1</i>	TGAAGGTGCCATCATCT	ATTGTGAAGGAGGGTTGG
<i>MDM2</i>	AGGCTATAATCTTCTGAGTC	ATCTTGATGCTGGTGTA
<i>LIG1</i>	CTTTGGAGGTCTTTAGGG	GAAGTGGCAACAGAGAAG
<i>XPF</i>	AGATGAATGCTTCTTGACA	GGTTGACTTCTTGACTGATA
<i>CHK2</i>	AGGCACCACTTCCAAGAG	GCACGTGCTACTAAGCAGAAAT
<i>DDB2</i>	GCATTCTGAGATTCCAAAGC	TGTAGCCTGGATGTGTCT
<i>ATR</i>	CAGATGACTTCACAGATT	AAGGCAGTTGTATTGAAT
<i>XRCC1#</i>	CCTCCTCCTTCACACGGAAC	CTCCCCCTTTGGCTTGAGTT
<i>RAD50</i>	TATAAGTTCTCCATTGACATC	AGACGACCATCATTGAAT
<i>clAP</i>	CGATAATACTAGCAATGACCAA	CACCTGGAACAAAGCATT
<i>NBS1</i>	GTCTTGAGGTGTTGTCTT	ATTGGATTGGCGGTGATT
<i>MLH3</i>	CTTCTATTCTCTGCCTAA	TGTAAACAGTGATAACCTA
<i>BAX</i>	CAGAAGGCACTAATCAAG	ATCAGATGGGTCTATAATG
<i>CASP2</i>	TCTGGTCACATAGAACAT	GAGAGAAAGAACTGGAATT
<i>OGG1</i>	GATGTTGTTGTTGGAGGAA	AAGAGGTGGCTCAGAAAT
<i>LIG3</i>	GGAATAGGCACAGTTCTT	GCTATATGTCTTTGGCTTTC
<i>MRE11a</i>	GGTTGCCATCTTGATAGTT	GCCTGTCCAGTTTGAAAT
<i>BECN1</i>	CTGTGGTAAGTAATGGAG	GGATGGAAGGTCTAAGA
<i>APAF1</i>	AAGACGAAGATTTCCTTA	TGTAGTATCTTTAATTGGTG
<i>ATG7</i>	AACCTTGTCGAAGCTAA	GAACCTTCAGTGAATGTATG
<i>XIAP</i>	CCGAAGAGAAACCACATTT	CTGAGCCAGATCAAAGTATG
<i>NOS2</i>	CTCCACATTGTTGTTGAT	AATCCAGATAAGTGACATAAG
<i>XPG</i>	TCTATCGCTTGAGGATTATGA	CAGTTCAGAAGAGGAAGATG
<i>RAD52</i>	TGTTGTATCTTGCCCTCCT	CAGTTGCCCTCTTGAAGTG
<i>NOX1</i>	CACACTGCGAGGATGAC	ATGACAATAGCCTTGATTCTCA
<i>PUMA</i>	TTCAGTTTCTCATTTGTTAC	TAAGGATGGAAAGTGATG
<i>ATM</i>	GGAATCTGAATGCCGATCTAG	TATCTGCTGCCGTCAACTA

Abb. 6.17: Sequenz Primer von Sigma Life Science Array_HD/Array_HUMAN, Eurofins Genomics* oder Invitrogen#

Publikationsverzeichnis/Kongressteilnahmen

Publikationsverzeichnis

Bergholz, L. M., Subic-Wrana, C., Heylmann, D., Beutel, M. E., Wiltink, J. and Kaina, B., DNA damage in lymphocytes of patients suffering from complex traumatization. DNA Repair, 2017

Heylmann, D. and Kaina, B., The γ H2AX DNA damage assay from a drop of blood. Sci Rep, 2016, 6:22682

Heylmann, D. Rödel, F., Kindler, T. and Kaina, B., Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. Biochim Biophys Acta, 2014;1846(1):121-9

Heylmann, D., Bauer, M., Becker, H., van Gool, S., Bacher, N., Steinbrink, K. and Kaina, B., Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. PLoS One, 2013;8(12):e83384

Bauer, M., Goldstein, M., Heylmann, D. and Kaina, B., Human monocytes undergo excessive apoptosis following temozolomide activating the ATM/ATR pathway while dendritic cells and macrophages are resistant. PLoS One, 2012;7(6):e39956

Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D. and Kaina, B., Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. PNAS, 2011, 108(52):21105-10

Mitbetreute Masterarbeiten

Anna Blöcher: „Sensitivität von Humanen Monozytären und Lymphoblastoiden Zelllinien gegenüber *tert*-BOOH und Ionisierender Strahlung“

Tobias Haak: „Untersuchung der Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung in menschlichen Blutzellen, insbesondere in Granulozyten“

Nisinha Mahendrarajah: „Sensitivität von Humanen Monozytären und Lymphoblastoiden Zelllinien gegenüber *tert*-BOOH und Ionisierender Strahlung“

Lehre

- Seminar „Toxikologie für Naturwissenschaftler“ mit dem Thema: „Strahlensensitivität von Blutzellen“, Vortrag und Diskussion
- Progress-Seminar „Molekulare und Genetische Toxikologie“, Vortrag und Diskussion

Kongressteilnahmen

2016

- Symposium „DNA damage response, genetic instability and cancer“, Mainz, Vortrag
- GUM (Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung), München, Vortrag und Poster
- GBS (Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung), Erlangen, **Poster mit Posterpreis**
- DGDR (Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung), Essen, Poster

- 7th DNA Repair Workshop (*Cancer Research Institute, Biomedical Research Center of Slovak Academy of Sciences, Cancer Research Foundation Slovakia*), Smolenice, Slovakia, Vortrag
- 2. FZI-Retreat (Forschungszentrum für Immuntherapie Mainz), Bad Dürkheim, Vortrag

2015

- EACR (*European Association for Cancer Research*), Essen, Poster
- GUM, Düsseldorf, Vortrag
- 1. FZI-Retreat, Seeheim-Jugenheim, Vortrag

2014

- CIMT (*Cancer Immunotherapy*), Mainz, Poster
- 2. GUM Workshop, Düsseldorf, Vortrag
- DGDR, Mainz, Poster
- GBS, Tübingen, Vortrag

2013

- CIMT, Mainz, Poster
- 1. GUM Workshop, Mainz, Vortrag
- DGfI (Deutsche Gesellschaft für Immunologie), Mainz, Poster
- GBS, Darmstadt, Poster

2012

- GUM, Mainz, Vortrag
- DGDR und GBS, München, Poster

Danksagung

Erklärung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von August 2011 bis Dezember 2016 am Institut für Toxikologie an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung des Institutsdirektors Prof. Dr. Bernd Kaina durchgeführt.

Teilaspekte der Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Die Publikationen hierzu sind im Kapitel Publikationsverzeichnis aufgelistet.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, März 2017

Daniel Heylmann

Lebenslauf