

5 Methoden und Materialien

5.1 Methoden

5.1.1 Zellkulturtechnik

5.1.1.1 Kultivierung humaner Fibroblasten

Die Kultivierung humaner Fibroblasten erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen (Ø 32 mm oder Ø 150 mm), auf Glasplättchen (Ø 30 mm) oder auf einer Polypropylenfolie (Ø 8 mm). Die Fibroblasten wachsen einschichtig als Monolayerkultur. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Zellproliferation durch den gegenseitigen Kontakt inhibiert und die Zellen halten in der G₁-Phase des Zellzyklus an. Die Kontaktinhibition der Zellen wird durch Neu-Aussaat aufgehoben.

Zur Subkultivierung (Passagieren) wurden die adhärennten Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml pro 75 cm² Kulturflasche) 5 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Ablösen vereinzelt. Das Trypsin wurde durch Zusatz von Kultivierungsmedium inaktiviert, die Zellzahl mit dem Zell-Zähler (CASY; Schärfe Systems) oder Cell-Counter (Beckmann Coulter Z2, Krefeld) bestimmt und die Zellen in gewünschter Zelldichte ausgesät. Unter Standardbedingungen wurden 7 000 Zellen /cm² eingesät. Alle 3-4 Tage wurde das verbrauchte durch frisches Medium ersetzt. Nach ca. 20 Tagen wurde ein Aliquot der Fibroblastenkultur in eine neue Flasche überführt. Für Versuche mit konfluenten Fibroblasten wurden 100 000 Zellen in Zellkulturschalen (Ø 32 mm) eingesät und nach ca. 14 Tagen mit einer Zelldichte von ca. 4×10⁴ Zellen/cm² verwendet. Ein Mediumwechsel wurde zuletzt drei Tage vor einem Versuch durchgeführt.

Die Experimente in der Mikrostrahl-Anlage erforderten Zellen, die auf der Polypropylenfolie wachsen. Hierfür erfolgt die Aussaat der Fibroblasten 3 Tage vor dem Versuch in einer Zelldichte von 7 000 durchgeführt.

Die Fibroblasten haben in Kultur eine begrenzte Lebensdauer und differenzieren nach einer mitotisch aktiven Phase aus. Die Charakterisierung des Alters erfolgte über die Dokumentation der Passage und Berechnung der Anzahl der Verdopplungen der jeweiligen Kultur. Nach jeder Passage wurde die Anzahl der Verdopplungen (PD) berechnet:

$$PD = \ln [N/(N_0 \times AE)] / \ln 2$$

PD: Anzahl der Verdopplungen; N: Gesamtzellzahl (geerntet); N₀: Anfangszellzahl (inokuliert); AE: Anheftungseffizienz

Die Anheftungseffizienz betrug bei regelmäßigem Passagieren etwa 0,8. Bei Auftauvorgängen wurde sie genau ermittelt.

Für die Gesamtzahl der Verdopplungen wurde die Summe aller Verdopplungen gebildet:

$$CPD \text{ (cumulative population doublings)} = \Sigma PD$$

In dieser Arbeit verwendete AG-Zellen hatten eine CPD zwischen 20 und 40. Die Passagenzahl betrug 14-18. Für Versuche mit AT-Zellen wurde die zweite Passage nach dem Erwerb der Zellen verwendet.

5.1.1.2 Kultivierung der Karzinomazelllinien

Die Kultivierung der humanen und Ratten-Karzinoma-Zellen erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen (75 cm²) oder Zellkulturschalen (Ø 32 mm) im entsprechenden Kulturmedium.

Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml pro 75 cm² Kulturflasche) 5 min bei 37°C inkubiert und nach dem Ablösen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Das Trypsin wurde durch Zugabe des Kultivierungsmedium inaktiviert, die Zellzahl mit dem Zell-Zähler (CASY; Schärfe Systems) oder Cellcounter (Beckmann Coulter Z2, Krefeld) bestimmt und die Zellen in gewünschter Dichte ausgesät. Für die weitere Kultivierung wurden 1×10⁶ Zellen in eine 75 cm² und für Experimente 3×10⁵ Zellen in eine Zellkulturschale (Ø 32 mm) eingesät und nach 3 Tagen verwendet. Bei den Ratten-Prostata-Tumorzellen R-3327-AT-1 erfolgte der Mediumwechsel jeden Tag.

Um Revertanten auszuschließen, wurden HCT116-Zellen mit deletiertem p53-Gen, regelmäßig unter Selektionsbedingungen im Genitacin-haltigen Medium (G418) kultiviert. Zusätzlich wurde das Fehlen des p53-Proteins durch Western-Blot-Analyse bestätigt.

In regelmäßigen Abständen wurde überprüft, ob die Kulturen mykoplasmenfrei waren. Der Überstand der Kulturen wurde mit dem Mycoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim) mit der ELISA-Methode untersucht. Alle Kulturen wurden als mykoplasmenfrei identifiziert.

5.1.1.3 Langzeitlagerung der Zellen

5.1.1.3.1 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden abtrypsiniert und die Zellsuspension 10 min bei 107 x g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration 1×10⁶ Zellen pro ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Temperaturabsenkung während des Einfrierens erfolgte schrittweise (ca. 1°C pro min) in einem Isopropanolbehälter bei - 80 °C für 24 h. Die Zellen wurden dann in den flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

5.1.1.3.2 Auftauen der Zellen

Nach dem Auftauen im Wasserbad (37 °C) wurden die Zellen sofort in das vorgewärmte Kulturmedium überführt. Nach vier Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und über die Bestimmung des Verhältnisses der abgelösten zu angehefteten Zellen die Anheftungseffizienz errechnet.

5.1.2 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von Zellen erfolgte mittels Lipofectamin (Invitrogen, USA) oder FuGENE (Roche, Schweiz) nach Vorgaben des Herstellers. Ebenso wurde die Methode der Elektroporation mittels AMAXA (Köln, Deutschland) getestet. Die Transfektionsbedingungen wurden durch Einsatz verschiedener Zellsorten, Zelldichten und DNA-Mengen optimiert. Nach Inkubationszeiten zwischen 12-48 h wurden die Zellen entweder zur Bestimmung der Transfektionseffizienz oder für indirekte Immunfluoreszenzanalysen fixiert oder zur Erzeugung von Zellklonen expandiert.

5.1.3 Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien

5.1.3.1 Behandlung normaler humaner Fibroblasten mit Wortmannin und Koffein

Zur Inhibition der Phosphatidylinositol-3OH-Kinasen ATM, ATR und DNA-PK wurden die Zellen mit Wortmannin (Paull et al. 2000) und Koffein (Blasina et al. 1999, Sarkaria et al. 1999) behandelt. Wortmannin ist ein Stoffwechselprodukt aus dem Pilz *Penicillium fusiculosum*. Das Koffein wird chemisch als Trimethylxanthin bezeichnet und gehört zur Gruppe der natürlich vorkommenden Purine.

Konfluente humane Fibroblasten (AG-Zellen) wurden mit einer Konzentration von 150 μM oder 200 μM Wortmannin und 15 mM Koffein im Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden unterschiedlich lange vor als auch nach der Bestrahlung mit Wortmannin behandelt. Je nach Versuch wurden die Proben 0, 0,5 oder 1 h vor der Bestrahlung und 0,5 h, 2 h oder 5 h nach der Bestrahlung bei 37 °C unter Zellkulturbedingungen mit dem Inhibitor inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit Koffein vor der Bestrahlung dauerte 1 h und sie wurden anschließend 15 min, 2 oder 5 h mit Koffein inkubiert. Für alle Versuche wurden mit Wortmannin oder Koffein behandelte unbestrahlte sowie unbehandelte bestrahlte und unbestrahlte Proben mitgeführt.

5.1.3.2 Behandlung der Zellen mit einem hypotonischen Puffer

Eine Behandlung der Zellen mit einem milden hypotonischen Puffer bewirkt, ohne Induktion von DSBs, eine Veränderung der Chromatin- und Chromosomenstruktur (Bakkenist und Kastan 2003, Earnshaw und Laemmli 1983). Konfluente humane Fibroblasten (AG-Zellen) wurden mit einem hypotonischen Puffer (50 mM NaCl, 0,45% (w/v) Glucose und 1% (v/v) FCS in PBS) 1 h vor Bestrahlung unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Proben bestrahlt und 15 Minuten, 1, 2 oder 5 h inkubiert. Es wurden behandelte unbestrahlte sowie unbehandelte bestrahlte und unbestrahlte Proben mitgeführt.

5.1.3.3 Behandlung der Zellen mit Lactacystin und Cycloheximid

Lactacystin (LC) und Cycloheximid (CHX) sind Stoffwechselprodukte aus *Streptomyces*. Lactacystin inhibiert irreversibel das 20 S Proteasom und somit die proteasomale Degradation der Proteine (Fenteany und Schreiber 1998). Cycloheximid unterbindet die Peptidneusynthese, durch die Hemmung der Bindung, des Transfers und der Freisetzung der tRNAs an den Ribosomen (Obrig et al. 1971).

Konfluente humane Fibroblasten wurden mit 10 μM Lactacystin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid auf verschiedene Weise behandelt. Für die gleichzeitige Hemmung des Abbaus und der Neusynthese der Proteine wurden beide Inhibitoren zeitgleich eingesetzt. Die Zellen wurden 5 h Bestrahlung mit LC inkubiert und zum Zeitpunkt 0,5 h vor Bestrahlung wurde CHX dazugegeben. Nach der Bestrahlung erfolgte 5-stündige Inkubation im Medium mit beiden Inhibitoren. Die Proteinneusynthese wurde durch Zugabe von nur CHX 0,5 h vor Bestrahlung gestört. Die Proben wurden dann 5 h nach Bestrahlung mit CHX inkubiert und aufgearbeitet oder weitere 12 h im normalen Zellkulturmedium gehalten und dann aufgearbeitet. Die Akkumulation der Proteine wurde durch Inhibition des Proteinabbaus erreicht. Hierbei wurden die Zellen mit LC im Medium 5 h vor und 5 h nach Bestrahlung inkubiert.

5.1.3.4 Behandlung der Zellen mit Nutlin-3

Nutlin-3 induziert die Akkumulation von p53, indem es die p53-MDM2 Interaktion inhibiert (Vassilev et al. 2004). MDM2 bindet an p53 und inhibiert dadurch die transkriptionelle Akti-

vität sowie die Stabilität von p53. MDM2 fungiert als E3 Ligase und führt p53 dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu.

Konfluente humane Fibroblasten und embryonale Mausfibroblasten wt und parp -/- wurden mit 5 μ M Nutlin-3 im Kulturmedium 2 h vor und anschließend 2, 5 oder 20 h nach Bestrahlung unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

5.1.3.5 Behandlung der Zellen mit Etoposid und Camptothecin

Camptothecin (CPT) inhibiert spezifisch Topoisomerase I. Topoisomerase I ist an Prozessen während der Replikation, Transkription und Rekombination beteiligt. Während der katalytischen Aktivität von Topoisomerase I entsteht eine transient kovalente Verbindung `cleavable complex` zwischen dem Enzym und der DNA. Camptothecin bindet nichtkovalent an diesen Komplex und verhindert die Topoisomerase I-vermittelte Ligation der DNA (Fan et al. 1998). Als Resultat entstehen Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA, die zur Termination der Replikation und Inhibition der Transkription führen. Etoposid ist ein Epidophyllotoxin-Derivat und inhibiert die Topoisomerase II. Die Topoisomerase II katalysiert die Entwindung der DNA-Doppelhelix durch Setzen transienter DSBs und ist essentiell für die Chromosomen-Kondensation und Trennung während der Mitose. Etoposid stabilisiert den Topoisomerase II-DNA-Komplex und verhindert die Religation der Bruchenden. Dadurch wird die Proliferation inhibiert (Robert und Larsen 1998). Konfluente und sich teilende Fibroblasten Population wurden mit 1 μ M CPT oder 50 μ M Etoposid im Medium 5 oder 24 h inkubiert. Es wurden unbehandelte Kontrollen mitgeführt.

5.1.3.6 Induktion eines DNA-Doppelstrangbruchs durch enzymatische Behandlung

Die Induktion eines DNA-Doppelstrangbruchs pro Zellkern erlaubt das System von Peter Bryant (Universität von St. Andrews, UK). Hierzu beschriebene Versuche wurden freundlicherweise von Jeanette H. Rudolph während ihres Aufenthaltes im Labor von P. Bryant durchgeführt.

Das System besteht aus Muntjak-Hirschzellen, die stabil einen Vektor mit einer 18 bp langen Sequenz, die die I-SceI-Restriktionsendonuclease aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert, exprimieren. Die Expression von I-SceI wird durch Zugabe des Hormonanalogs Ponasterone A induziert. Die geschnittenen DNA charakterisieren 3'- und 5'-überhängende DNA-Enden. Die Restriktionsendonuclease schneidet sehr selten und für Muntjak-Zellen wurde eine Schnittstelle pro Zellkern beschrieben (Rogers-Bald et al. 2000).

5.1.4 Zellbestrahlung

5.1.4.1 Schwerionenbestrahlung mit niederenergetischen Ionen

Die Bestrahlung mit niederenergetischen Ionen erfolgte am Linearbeschleuniger UNILAC (Universal Ion Linear Accelerator) der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in der biologischen Bestrahlungsanlage BIBA 2. Die Dosimetrie wurde mit einer bei der GSI entwickelten Ionisationskammer durchgeführt. Die Kalibrierung der Ionisationskammer erfolgte mit Plättchen aus CR39-einem Kunststoff, auf dem die Ionenspuren nach Bestrahlung durch Ätzen mit NaOH mikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Die Ionenspuren wurden anschließend automatisch mit einem Bildbearbeitungsprogramm ausgezählt und die Homogenität des Strahls überprüft.

Für die Bestrahlung wurden Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 32 mm) oder auf Glasplättchen (\varnothing 30 mm), die in Kulturschalen platziert wurden, kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Kulturschalen in einem mit Kulturmedium gefüllten kalten oder auf 37 °C

vorgewärmten Kunststoffmagazin angeordnet und auf Eis oder mit auf 37 °C vorgewärmten Thermoblöcken zum Beschleuniger und zurück transportiert.

Die Glasplättchen wurden in Zellkulturschalen (Ø 32 mm) mit Hilfe eines Gummiringes fixiert. Im Fall der Bestrahlung von nur einem Teil des Glasplättchen erfolgte die Abdeckung des unbestrahlten Kontrollbereiches mit selbst entworfenen Aluminium-Plättchen (1 mm Dicke), die mit Hilfe von Gummi-Ringen für die Zeit der Bestrahlung in der Kulturschale fixiert wurden.

Mit Inhibitoren vorbehandelte Zellen wurden in einem mit H₂O_{bidest} befeuchteten Magazin ohne Medium bestrahlt. Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen mit einer Mylar-Folie (Ø 32 mm, Dicke 12 µm) bedeckt.

Für die Bestrahlung der Proben in einem Winkel von 90° zum Strahl wurden die Proben nacheinander von einem Greifarm aus dem Magazin gehoben und in den Strahl gehalten. Die Bestrahlungszeit einzelner Proben lag im Mittel bei ca. 10 Sekunden. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen aus dem Magazin entnommen, gleich verarbeitet oder mit konditioniertem Kulturmedium überschichtet und unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Bei allen Versuchen wurden Kontrollen mitgeführt, welche den gleichen Bedingungen wie die bestrahlten Proben ausgesetzt waren.

Für die Bestrahlung der Zellen unter einem kleinen Winkel (ca. 15°) zum Strahl wurden auf Glasplättchen kultivierte Zellen eingesetzt und auf einer in der GSI konstruierten Halterung platziert (Jakob et al. 2003). Die Zeit für die Positionierung und Bestrahlung betrug ca. 2-3 min. Anschließend erfolgte die Überführung der Zellen in das Kulturmedium.

Folgende Ionen, wenn nicht anders angegeben, wurden zur Bestrahlung verwendet:

Ion	Energie auf Target (MeV/u)	LET (keV/µm)	Fluenz (Teilchen/cm ²)	Dosis (Gy)	mittlere Dosis/Ionendurchgang (Gy)
Kohlenstoff	4,5	301	2×10 ⁶	0,96	0,2
Magnesium	8,2	720	2×10 ⁶	2,3	0,5
Chrom	6,1	2700	2×10 ⁶	8,6	1,72
Nickel	5,3	3599	2×10 ⁶	11,5	2,3
Krypton	5,2	5140	2×10 ⁶	16,5	3,3
Xenon	4,2	8877	2×10 ⁶	28,4	5,7
Blei	4,1	13485	2×10 ⁶	43,2	8,6
Uran	4	14878	2×10 ⁶	47,7	9,5

Abbildung 62. Zusammenfassung der verwendeten niederenergetischen Ionen.

Die Dosis wurde nach folgender Formel berechnet (s. Einleitung 1.1): $D \text{ (Gy)} = 1,602 \times 10^{-9} \times LET \text{ (keV/}\mu\text{m)} \times F \text{ (1/cm}^2\text{)} \times 1/\text{Dichte (cm}^3\text{/g)}$. Bei einer mittleren Fibroblasten-Fläche von 250 µm² werden bei einer Fluenz von 2×10^6 Teilchen/cm² im Mittel 5 Treffer erwartet. Die Dosis dividiert durch die erwartete Anzahl Treffer pro Kern ergibt die mittlere Dosis pro Ionendurchgang.

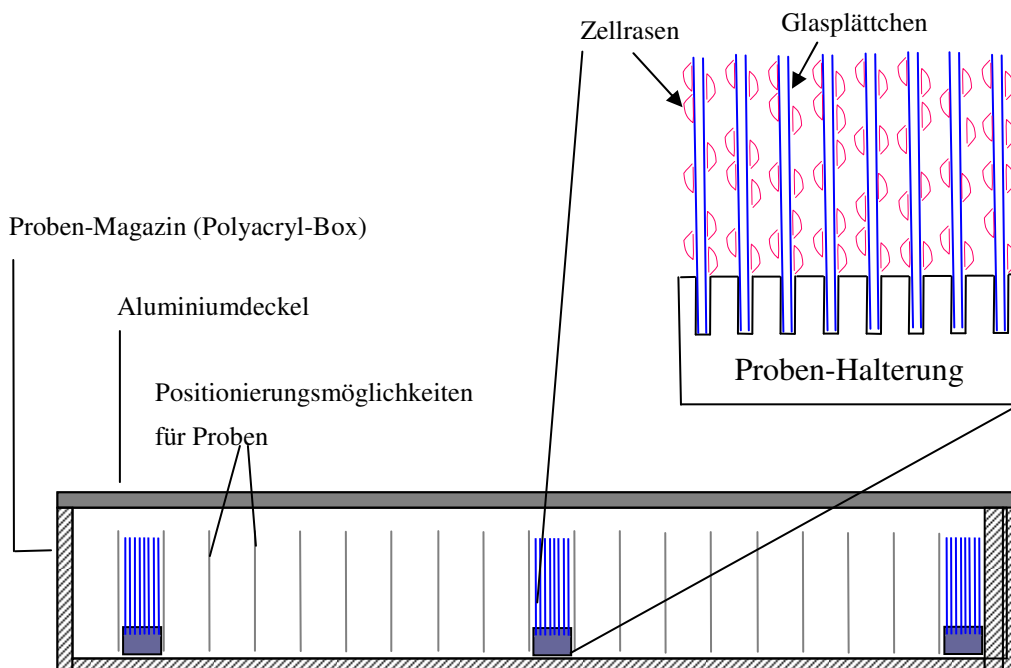
5.1.4.2 Schwerionenbestrahlung mit hochenergetischen Ionen

Die Bestrahlung mit ¹²C-Ionen wurde am medizinischen Patientenstrahlplatz des Schwerionensynchrotron (SIS) der GSI durchgeführt und fand in Nachtschichten, nach der tagsüber erfolgten Patientenbestrahlung, statt. Für die Dosimetrie wurden Ionisationskammern eingesetzt (Karger et al. 2002).

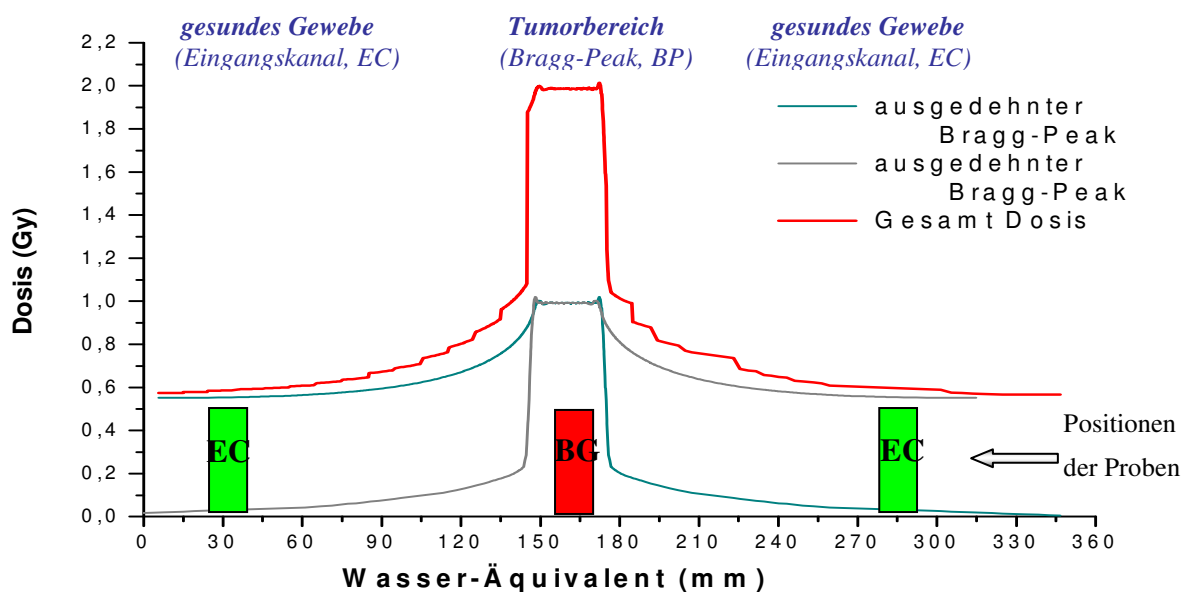
Für die Bestrahlung unter Bedingungen, welche die Bestrahlung eines Patienten mit Kohlenstoffionen simulieren, wurde ein Versuchsmodell entwickelt, bei welchem ein Wasserphantom als Gewebeäquivalent verwendet wurde. Für die Bestrahlung wurden Zellen auf Glasplättchen (\varnothing 30 mm) in Kulturschalen kultiviert. Mit Zellen bewachsene Glasplättchen wurden in der Probenhalterung platziert, wobei jeweils zwei Plättchen mit der zellfreien Seite aneinander gelegt und in den Schlitz der Probenhalterung geschoben wurden. Die Probenhalterungen mit jeweils 16 Proben wurden an den definierten Positionen im Magazin untergebracht und das Magazin mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium aufgefüllt (s. Abbildung 63a).

Zur Positionierung des Magazins mit den Proben dienten Laserstrahlen, die das Isozentrum des Strahls, welches 110 cm hinter dem Austrittsfenster entfernt liegt, auf das Magazin projizierten. Die Bestrahlung wurde wie während der Tumorthherapie mit dem tumorkonformen Rasterscan-Verfahren durchgeführt; da wird der Tumor bzw. hier das Magazin mit den Proben in Schichten aufgeteilt. Der Stahl wird Punkt für Punkt über das Bestrahlungsfeld geführt. Die Reichweite in die Tiefe resultiert aus der Variation der Energie der Ionen. Die verwendeten 13 Energien lagen zwischen 275 und 300 MeV/u bei einer Fluenz von 26×10^6 Teilchen/cm² und das Dosis-Profil wurde in der Abbildung 63b aufgetragen. Das Magazin wurde zuerst von einer Seite und nach einer Drehung um 180° von der anderen Seite mit identischer Dosisverteilung bestrahlt. Das resultierende Tiefendosisprofil des eindringenden Kohlenstoffstrahls wurde in der dargestellt und entspricht dem im Gewebe des Patienten bei einer Therapie auftretenden Profil sowohl im Eingangskanal (gesundes Gewebe) wie auch im ausgedehnten Bragg-Peak (Tumorbereich). Die Dosis im Eingangskanal lag bei 0,6 Gy bei einem mittleren LET von 65 keV/μm und im ausgedehnten Bragg-Peak-Bereich betrug die Gesamtdosis 2 Gy bei einem mittleren LET von 13 keV/μm. Die Berechnung des Bragg-Peak-Bereichs wurde während der Durchführung dieser Arbeit erneut überprüft. Die Breite des Bragg-Peaks wurde korrigiert. Die tatsächliche Ausdehnung des Bragg-Peak-Bereichs ist kleiner als angezeichnet. Es wurde allerdings experimentell überprüft, dass alle eingesetzten Proben im Bestrahlungsfeld liegen.

Die Transport- und Bestrahlungszeit betrug insgesamt ca. 30 min. Anschließend wurden die Glasplättchen mit den Zellen in Zellkulturschalen mit vorgewärmtem Medium überführt und für die definierte Zeit unter Zellkulturbedingung inkubiert. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden gleichen Bedingungen ausgesetzt.



a) Aufbau des Experimentes. Im Magazin befanden sich an definierten Stellen Probenhalterungen (1 cm breit, auf die Mitte der Probenhalterung bezogen von der linken äußeren Kante des Magazins betrachtet bei: 2,4 cm, 16 und 29,4 cm), in welchen jeweils zwei Glassplättchen bewachsen mit Zellen in vorhergesehenen Aussparungen platziert wurden.



b) Das Tiefendosisprofil. Die Probenhalterungen wurden an definierten Positionen (s.auch oben) platziert und zuerst von einer Seite mit der Dosisverteilung des ausgedehnten Bragg-Peaks (grüne Kurve) und anschließend nach einer Drehung um 180° noch mal mit der identischen Dosisverteilung (graue Kurve) bestrahlt. Die gesamte deponierte Dosis wurde rot dargestellt. Hieraus ergibt sich eine Dosis von 2 Gy und der mittlere LET von 65 keV/μm im Bereich des ausgedehnten Bragg-Peaks (Tumorbereich) und eine Dosis 0,6 Gy im Eingangskanal (gesundes Gewebe) bei einem mittleren LET von 13 keV/μm.

Abbildung 63. Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen zur Simulation der Patientenbestrahlung: a) der Aufbau des Experimentes, b) das Tiefendosisprofil.

5.1.4.3 Schwerionenbestrahlung mit der Mikrostrahl-Anlage

In der Mikrostrahl-Anlage der GSI kann ein einzelner, ausgewählter Zellkern in einer lebenden Zelle mit einer definierten Anzahl von Ionen bestrahlt werden. Die Mikrostrahl-Anlage befindet sich im Bereich des Linearbeschleunigers UNILAC und wurde für die Bestrahlung mit niederenergetischen Ionen eingesetzt. Die Präzision der Bestrahlung liegt bei wenigen μm . Die Positionen der bestrahlten Zellkerne können nach dem Beenden der Experimente wieder angefahren und mikroskopiert werden (Heiß et al. 2006).

Für die Bestrahlung wurden humane Fibroblasten in speziellen Kammern auf einer für die Zellkultur vorbereiteten Polypropylenfolie (\varnothing 8 mm) kultiviert. Die automatische Zellkern-Erkennung wurde durch vorherige Färbung der DNA mit einer Hoechst 33342-Lösung (100 nM Hoechst im Medium) ermöglicht, wobei die UV-Exposition auf die notwendigste Zeit verkürzt wurde, um UV-bedingte DNA-Schädigung zu minimieren. Für die Bestrahlung wurden die Kammern mit Medium vollständig gefüllt (Mediumschicht von 0,8 mm) und verschlossen, da die Bestrahlung horizontal zum Zellrasen erfolgte. Die Zeit der Positionierung und Bestrahlung betrug ca. 30 Minuten pro Kammer. Anschließend wurden die Kammern geöffnet, mit frischem Medium gefüllt und unter Zellkulturbedingungen für eine definierte Zeit inkubiert.

Die Bestrahlung erfolgte mit Ionen, die in einem geometrischen Muster (5 Ionen im Kreuz oder 3 in einer Linie) angeordnet waren. Bei Proben, die lange Zeit nach Bestrahlung (bis 24 h) inkubiert wurden, erfolgte die Bestrahlung von mehreren aneinander liegenden Feldern, um bei der durch die Bewegung der Zellen erschwerten Wiedererkennung der Zellen, Aufnahmen von nicht bestrahlten Zellen auszuschließen.

Ion	Energie auf Target (MeV/u)	LET (keV/ μm)
Nickel	4,8	3800
Gold	4,8	13000

Abbildung 64. Zusammenfassung der in der Mikrostrahl-Anlage verwendeten Ionen.

5.1.4.4 Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlung wurde mit einer Isovolt DS1 Röntgenröhre (Seifert) durchgeführt. Die Röntgenröhre wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 250 kV und einer Stromstärke von 16 mA betrieben. Die Röhre wurde mit einer Beryllium, Aluminium und Kupfer Filterkombination (7,1 mm und 1 mm Dicke), welche die weiche Röntgenstrahlung absorbieren, ausgestattet. Die Dosimetrie erfolgte mit dem Dosimeter SN4 (PTW Freiburg), das nach Fricke kalibriert wurde (Fricke und Hart 1966). Aufgrund der vertikal austretenden Röntgenstrahlen konnten die Proben wachstumstypisch bestrahlt werden. Der Fokusabstand vom Brennpunkt des Strahls zur Probe und somit die Dosisleistung war von der Fläche der Probe abhängig, wobei für die gleichen Experimente immer identische Einstellung verwendet wurde. Die Dosisleistung lag bei den Experimenten zwischen 0,7 und 2 Gy pro Minute.

Der Transport der Proben zur Röntgenröhre und zurück erfolgte in einem geschlossenen Behälter bei RT. Die Zellen wurden im Kulturmedium bestrahlt (2 oder 10 ml Medium pro Zellkulturschale \varnothing 32 oder 150 mm). Anschließend wurden die Zellen unter Zellkulturbedingungen eine definierte Zeit inkubiert. Bei allen Versuchen wurden Kontrollen mitgeführt, welche den gleichen Bedingungen wie die bestrahlten Proben ausgesetzt waren. Die applizierten Dosen lagen zwischen 0,05 und 20 Gy.

5.1.5 Bestimmung des Zellüberlebens nach Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoffionen

Die Messung des Zellüberlebens erfolgte nach dem Koloniebildungstest von Puck und Marcus (1995). Dabei wird eine Zelle als überlebende Zelle definiert, wenn sie in einem Zeitraum von 10-15 Zellzyklen mindestens 50 Tochterzellen bilden kann.

Auf Glasplättchen kultivierte konfluente humane Fibroblasten wurden nach Bestrahlung sowie von den gleich behandelten unbestrahlten Kontrollen trypsiniert, gezählt und ausgesät mit der Anzahl von ca. 100 Zellen pro Zellkulturflasche (75 cm²). Von jeder Probe wurden 6 Proben zur Messung des Zellüberlebens angesetzt. Nach 14 Tagen erfolgte die Färbung der Zellen mit Methylenblaulösung und die Auszählung der Kolonien unter einem Binokular. Das tatsächliche Überleben nach Bestrahlung ergibt sich aus der Division des Überlebens nach Bestrahlung durch das Überleben der Kontrollen. Die unbestrahlte Kontrolle überlebt definitiv zu 100%.

Das Ausplattieren der Zellen für die genannten Überlebenskurven fand parallel zu Präparation der Proben für die immunzytochemische Markierung von γ H2AX statt und erfolgte freundlicherweise mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Dr. W. Kraft-Weyrather.

5.1.6 Immunzytochemische Methoden

In der Arbeit wurde sowohl ein direktes als auch ein indirektes immunzytochemisches Verfahren angewandt. In dem direkten Verfahren wird das Antigen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, nachgewiesen. Bei der indirekten Methode bindet ein antigenspezifischer, unkonjugierter Antikörper an das Antigen. Diese Bindung wird durch die Kopplung eines zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, detektiert.

Die immunzytochemische Detektion der Proteine in den Zellen erfolgte entweder direkt nach der Fixierung oder nach vorheriger Extraktion der Zellen. Bei dem Extraktionsschritt werden Zellen permeabilisiert und lösliche, nicht an größere Moleküle gebundene Proteine extrahiert. Es wurden zwei Extraktionsmethoden verwendet - eine moderate mit dem Hapes-Extraktionspuffer (in Anlehnung an Pagano et al. 1994) oder eine stringente fraktionierte Extraktion (Mirzoeva und Petrini 2001).

Die Zellen wurden als adhärenter Rasen oder als Suspension für die Messung im Durchfluss-Zytometer gefärbt. Hierfür wurde von den Zellen das Medium abgenommen, der Zellrasen trypsiniert und anschließend das Trypsin mit Medium inaktiviert. Die Zellen wurden bei 1000 x g 8 min pelletiert und direkt mit Paraformaldehyd fixiert oder moderat extrahiert und für die Immunfärbung eingesetzt. Nach jedem Schritt der Immunfärbung erfolgte das Pelletieren Zellen bei 1000 x g 8 min.

5.1.6.1 Moderate Extraktion

Das Medium wurde von den Proben abgenommen und die Mediumreste mit H₂O_{bidest} abgespült. Anschließend wurden die Zellen auf Eis durch 10-minütige Inkubation mit dem Hapes-Extraktionspuffer, einem hypotonischen Puffer mit nichtionischem Detergenz (0,1 % (v/v) Triton X-100) extrahiert. Danach erfolgte die Fixierung der Proben mindestens 20 min bei RT mit frisch angesetzttem 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS. Nach dem Fixieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

5.1.6.2 Fraktionierte Extraktion

Das Medium wurde von den Proben abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden jeweils 5 min mit dem 'Cytoskeleton Buffer' (10 mM Pipes pH 6,8, 100 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100) und mit dem 'Cytoskeleton Stripping Buffer' (10 mM Tris-Base, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 % (v/v) Tween 40, 0,5 % Na-desoxycholate, pH 7,4) auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen, 30 min bei RT mit 'Modified Streck Tissue Fixative' (150 mM 2-Bromo-1-nitro-1,3-propandiol, 108 mM Diazolidinylurea, 10 mM Na-Citrat, 50 mM EDTA, pH 5,7) fixiert und 15 min mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS bei RT permeabilisiert. Die Proben wurden anschließend mit PBS gewaschen.

5.1.6.3 Direkte Fixierung mit Paraformaldehyd

Das Zellkulturmedium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS 20 min inkubiert. Nach Abnahme des Paraformaldehyds erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100. Anschließend wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen.

5.1.6.4 Direkte Fixierung mit Methanol

Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen mit 100 % Methanol bei -20 °C 10 Minuten inkubiert. Nach anschließendem zweimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % (v/v) Triton X-100. Die Proben wurden mit PBS gewaschen.

5.1.6.5 Immunfärbung

Die Absättigung der unspezifischen Antikörperbindungen erfolgte durch Behandlung der Proben mit einer BSA-Lösung (0,5 % (w/v) in PBS) für mindestens 0,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Proben wurden dann 45 min mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in der BSA Lösung (0,5 % w/v in PBS) in der angegebenen Konzentration angesetzt (Abschnitt 5.2.4). Um den Antikörperverbrauch zu minimieren, wurde ein kleines Volumen der Antikörperlösung (50 µl pro Zellkulturschale Ø 32 mm) verwendet. Durch das Auflegen einer Mylar-Folie (Ø 32 mm) wurde die Lösung gleichmäßig verteilt und dadurch das Austrocknen der Zellen verhindert.

Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Proben wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper 0,5 h bei RT, ebenfalls 50 µl pro Zellkulturschale unter Verwendung der Mylar-Folie, inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden mit Alexa Fluor 488- oder Alexa-Fluor-568-markierte IgG-Fragmente (5µg/ml; Molekular Probes) verwendet.

Für eine gleichzeitige Detektion von zwei Proteinen wurden während der ersten Antikörperinkubation zwei Erstantikörper zeitgleich - ein monoklonaler Maus- und ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper - verwendet. Die zweite Inkubation erfolgte mit entsprechenden Sekundärantikörpern, von welchen einer mit Alexa Fluor 488- und der andere mit Alexa Fluor 568 F(ab')₂-IgG-Fragment gekoppelt war.

Für die direkte immunzytochemische Anfärbung der Proteine erfolgte zuerst eine Kopplung des spezifischen Primärantikörpers an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488. Hierfür wurde das Alexa 488 Zenon Mouse IgG Labeling Kit (Molecular Probes) angewandt. Unmittelbar vor der Färbung wurde im ersten Schritt die Antikörper-Lösung (1 µg Antikörper in 20 µl PBS) mit dem Alexa 488-Labeling Reagent versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von Zenon Blocking Reagenz, welches den ungebundenen Fluoreszenzfarbstoff bindet.

Nach 5 Minuten war die Antikörperlösung gebrauchsfertig. Die Proben wurden dann wie oben beschrieben 45 min mit dem Antikörper inkubiert und anschließend mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS 20 min fixiert, um die Diffusion des nicht kovalent an den Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern.

5.1.6.6 DNA-Färbung

Die Färbung der Zellkerne wurde direkt nach der Immunfärbung durchgeführt. Die DNA wurde mit Propidiumiodid (PI), TO-PRO3 oder 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Propidiumiodid und TO-PRO3 wurden zur Markierung der Zellkerne und DAPI für die Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts anhand der Fluoreszenzintensität im Durchfluß-Zytometer verwendet.

Für die Immundetektion eines einzelnen Proteins unter Verwendung des Alexa Fluor 488-Chromophors wurde die Kernfärbung durch 20 min Inkubation mit Propidiumiodid (1 μ M in PBS) durchgeführt. Propidiumiodid interkaliert in doppelsträngige DNA ohne eine Sequenzpräferenz und wurde bei 568 nm angeregt. Da Propidiumiodid neben der DNA auch die RNA markiert, wurde zur Verminderung des Hintergrundsignals ein gleichzeitiger RNA-Verdau durch Ribonukleasen durchgeführt (100 μ g/ml RNase A gelöst in PBS; Boehringer Mannheim). TO-PRO3 wurde alternativ zu Propidiumiodid und bei einer gleichzeitigen Detektion von zwei Proteinen, welche mit der Fluoreszenzanregung bei 488 nm und 568 nm analysiert wurden, eingesetzt. Die Fluoreszenz von TO-PRO3 wurde bei 646 nm angeregt. Die Inkubation der Zellen mit TO-PRO3 (1 μ M in PBS) erfolgte 20 min bei RT. Der Farbstoff interagiert vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen, sowie Interkalation mit der DNA analog zu anderen Cyaninfarbstoffen (Angaben des Herstellers: Molecular Probes). Anschließend wurde nicht gebundener Farbstoff durch Waschen mit PBS entfernt.

Für die Quantifizierung des DNA-Gehalts der Zellen wurde DAPI eingesetzt. DAPI bindet an sich wiederholende Adenin-Thymin-Basenpaare in der DNA. Für die Kernfärbung mit DAPI wurden die Zellen mit DAPI (1 μ M in PBS) versetzt und im Durchfluß-Zytometer analysiert.

5.1.6.7 Haltbarkeit

Die Proben für die Mikroskopie wurden bei 40 °C getrocknet und zur Haltbarkeit mit Vectashield Mounting Medium (ca. 25 μ l pro Probe; Vector Laboratories) und Deckglas versehen. Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 3 Monaten mikroskopisch analysiert.

5.1.6.8 Grundlegende Kontrollexperimente

Die spezifische Bindung der verwendeten Antikörper wurde in Kontrollexperimenten überprüft. Dazu wurden AG-Zellen mit 10 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und nach 17 h, wenn strahleninduzierte Foci von p53 und γ H2AX gut sichtbar sein sollten, moderat extrahiert, fixiert und mit folgenden Antikörpern in oben angegebenen Konzentrationen inkubiert: nur mit dem spezifischen Erstantikörper, nur mit einem der verwendeten Zweitantikörpern, mit normalem Maus-IgG-Serum (10 μ g/ml, Santa Cruz) und dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen, mit normalen Kaninchen-IgG-Serum (10 μ g/ml, Calbiochem) aus dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Maus, einem spezifischen Erstantikörper, entwickelt in Maus, und dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen, einem spezifischen Erstantikörper, entwickelt in Kaninchen und dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Maus. In diesen Kontrollen wurden keine Signale über dem Hintergrund detektiert (Daten nicht gezeigt).

5.1.7 Mikroskopische Bildanalyse und Auswertung der Proben, Entwicklung einer semi-automatischen Auswertungs-Software für Focizählung

Die mikroskopische Analyse wurde an einem konfokalen Laserscanning System Leica TCS, ausgestattet mit inversem Mikroskop DM IRBE (Objektiv: PlanApo 63x / 1,32 Öl), Argon-Krypton Laser und einem computergesteuerten Kreuztisch Märzhäuser SCAN 100x100 durchgeführt. Der Argon-Krypton Laser erlaubt Anregungen im Bereich des blauen (488 nm) grüngelben (568 nm) und dunkelroten (647 nm) Lichts.

Pro Probe wurden in der Regel ca. 2000 Zellen auf einem Bildfeld von ca. 0,05 cm² visuell betrachtet. Für die weitere mikroskopische Analyse wurde das erste Bildfeld willkürlich angefahren und von dieser Stelle wurden dann nebeneinander liegende Bildfelder mit dem Vergrößerungsfaktor 1 (Bildfläche 158,8 µm x 158,8 µm, Auflösung 1024 x 1024 Pixel) dem Vergrößerungsfaktor 2 (Bildfläche 79,4 µm x 79,4 µm, Auflösung 512 x 512 Pixel) und einer Schichtdicke von 0,5 µm, wenn nicht anders angegeben, aufgenommen. Pro Petrischale wurden für eine quantitative Auswertung ca. 150 Kerne untersucht. Die Analyse der Signale in Verbindung mit der Chromatinstruktur sowie Kolo-kalisation zwischen den Proteinen fand in Aufnahmen mit dem Vergrößerungsfaktor 4 und einer Schichtdicke von 0,234 µm, wenn nicht anders kommentiert, statt. Dabei wurde jede Schicht der Zellkerne analysiert. Da die Aufnahmen in einem Abstand von 0,234 µm erfolgten, wurde für Messung der γH2AX-Flächen jede zweite Schicht herangezogen, um über der Grenze der Auflösung des Mikroskops in der z-Ebene zu liegen. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden die Aufnahmen unter vergleichbaren Einstellungen des Mikroskops durchgeführt. Hier wurde auf konstante Einstellungen der Photomultiplier (PMT) (Spannung und Offset), der Lochblende (Pinhole) und der Leistung des Lasers geachtet.

Bei der visuellen Auswertung der Proben wurden als Focus deutliche Signale, die sich über mehr als eine Schicht erstreckten, gewertet. Sehr kleine einzelne Punkte wurden nicht gezählt. Diese Kriterien wurden für alle detektierten Proteine angewandt und in der Diplomarbeit (Y. Schweinfurth, geb. Borgiel 2002) etabliert. Zu den Methoden der quantitativen Auswertung der Foci nach Bestrahlung gehörte das direkte Auszählen der Foci in den Aufnahmen. Die direkte Auszählung war gut auf klar definierte, durch langsame Ionen induzierte Signale anwendbar. Für die Auswertung der Aufnahmen nach Röntgenbestrahlung und Bestrahlung mit hochenergetischen Ionen wurden Bildbearbeitungsprogramme hinzugezogen, da hier eine breite Größen- und Intensitätsverteilung der detektierten Proteinsignale festgestellt wurde. Die Analyse erfolgte zuerst mit Hilfe des frei erhältlichen Bildbearbeitungsprogramms ScionImage (Scion Corporation, Frederick, MD).

Um die Vielfältigkeit der Signale der detektierten Proteine, vor allem des DSB-Markers γH2AX schneller, flexibler und einfacher als bisher erfassen zu können, wurde in dieser Arbeit die Anforderung gestellt, ein auf der graphischen Datenverarbeitung basierendes Programm / Makro für Auswertung zu etablieren. Die Entwicklung dieser Programmierung wurde in folgende Vorgehensschritte aufgeteilt:

- Problemdefinition: Die Anforderung an das neue Makro war, Signale, die als Foci definiert werden, für jede Zelle einzeln zu erfassen. Das neu zusammengestellte Makro sollte alle benötigten Funktionen und Prozeduren in sich zusammenfassen, so dass zeitaufwendiges Wechseln zwischen einzelnen Bildbearbeitungsprogrammen erspart bliebe. Die Automatisierung der aufeinander folgenden Bearbeitungsschritte sollte deutliche Zeitersparnis mit sich bringen. Weiterhin wurde gewünscht, dass die gesamten Ergebnisse einer benutzerdefinierten Messreihe in einer Excel-kompatiblen Datei geschrieben werden und diese Daten dann rückwirkend der jeweiligen Aufnahme bzw. Zelle zugeordnet werden können.

- Problemanalyse: Für die Entwicklung der beschriebenen Anwendung wurde das käuflich erworbene Bildbearbeitungsprogramm Image-Pro Plus von Media Cybernetics ausgewählt. Die Programmierung wurde mit Hilfe der Programmiersprache Microsoft Visual C++ durchgeführt, wobei die Unterprogramm-Bibliotheken von Image-Pro Plus verwendet wurden.

- Als Programmentwurf für die Zählung der Foci diente die schon verwendete Reihenfolge an Anwendungen in der frei erhältlichen Scion Image Software (Scion Corp., Frederick, MD).

Die Programmierung der entworfenen Anwendungen in Microsoft Visual C++, die Compilation und die Korrektur der Anwendungen erfolgte durch Dr. Philippe Barberet.

- Die nächsten Schritte umfassten das Testen des Programms. Hierbei wurde das fertige Programm mit einer ausreichenden Anzahl bereits ausgewerteter Daten konfrontiert. Im Test wurden alle Randbedingungen erfasst. Beim Auftreten von Laufzeit- oder logischen Fehlern wurde das Programm korrigiert. Neben der Überprüfung mit Laboreignendaten erfolgte eine Auswertung von Datensätzen eines unabhängigen Labors (Dr. B. Volkmer, Dermatologisches Zentrum Buxtehude). Eine Übereinstimmung der Ergebnisse wurde festgestellt.

-Die Programmdokumentation auf der Programmierebene übernahm ebenso Philippe Barberet und die Dokumentation auf der Anwenderebene wurde in dieser Arbeit im Kapitel Ergebnisse zusammengefasst.

-Der nächste Schritt zur Etablierung einer funktionierenden Anwendung umfasst die Rückkopplung/ Feldversuch mit interessierten Nutzern, die in der nachfolgenden Zeit stattfinden kann.

Die weiteren in der Arbeit angewandten Bildanalysen wurden mit den Programmen Image-Pro Plus (Media Cybernetics), Scion Image Software (Scion Corp., Frederick, MD), Image J (NIH Image) und Photoshop (Adobe) durchgeführt.

5.1.8 Die Kolokalisationsanalyse

Bei der Kolokalisationsanalyse erfolgte die Messung der gegenseitigen räumlichen Beziehung von zwei Proteinen, die mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert wurden. Mit dem Programm Huygens Essentials (Scientific Volume Imaging BV, Hilversum, NL) erfolgte die Berechnung des Pearson-Koeffizienten (Manders et al. 1992, van Steensel et al. 1996) für individuelle Zellkerne. Die Intensitäts-Schwellenwerte für diese Analyse wurden für für alle Zellkerne einer Versuchsreihe nach gleichen Kriterien gesetzt.

5.1.9 Lebendzell-Beobachtungs-Experimente

Für die Lebendbeobachtung von Zellen wurde das System von Mikroskop Leica DM IRE 2 ausgestattet mit einer PCO Sensicam Kamera (PCO AG, Kelheim, Deutschland) und einer Zellkammer mit Zubehör von Bioptechs (Butler, USA).

eingesetzt. Die Beobachtung der lebenden Zellen nach Bestrahlung erfolgte mit Zellen, die auf Glasplättchen kultiviert wurden. Nach der Bestrahlung wurden Zellen in einer Zellkammer im DMEM Medium ohne Phenolrot (Biochrom) mit 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,5) platziert, dabei wurde die Kammer auf eine konstante Temperatur von 37°C gewärmt und das Medium konstant ausgetauscht. Während der Experimente wurden die Belichtungszeiten der lebenden Zellen und die Menge des Lichts auf das Erforderliche minimiert, um lichtinduzierte Schädigung der DNA zu reduzieren. Nach der manuellen Auswahl der Zellpositionen wurden diese automatisch in festgelegten Zeitabständen zwischen 20 min und 3 h angefahren, fokussiert und aufgenommen. Dabei wurden pro Position 5 Aufnahmen entlang der Z-Achse durchgeführt mit einer Belichtungszeit von 0,5 oder 0,3 s.

Die Betrachtung der aufgenommenen Serien erfolgte im ImageJ 1.37v Software (NIH, USA) mit Image5D Plugin. Die Zählung der 53BP1-GFP Foci wurde per Auge durchgeführt mit der Einteilung der 53BP1-GFP Foci in drei Klassen: groß, klein und sehr klein. Für die Auswertung wurden alle 5 Aufnahmen in der Z-Ebene einbezogen.

5.1.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse umfasste die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung und des Fehlers des Mittelwertes. Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Probe 100 bis 150 Zellkerne analysiert. Die Berechnungen wurden in Programmen Excel (Microsoft) und Origin 7G SR1 (OriginLab Corp.) durchgeführt. Für Berechnung der Annäherung an die Poisson-Funktion wurde die Internetseite <http://faculty.vassar.edu/lowry/poissonfit.html> genutzt.

5.1.11 Flußzytometrische Bestimmung der Zellzyklusanteile einer Zellpopulation

Beim Durchlaufen des Zellzyklus mit abschließender Zellteilung verändert sich die Menge der DNA im Zellkern. In der G_0/G_1 -Phase ist der DNA-Gehalt am niedrigsten. Während der S-Phase synthetisiert die Zelle kontinuierlich neue DNA. Nachdem die DNA verdoppelt wurde, befindet sich die Zelle in der G_2 -Phase. Anschließend teilt sich die Zelle in der Mitose und die DNA wird auf zwei Tochterzellen verteilt.

Um die Zellzyklusverteilung der verwendeten Zellpopulation zu ermitteln, wurden parallel zu allen Versuchen flußzytometrische Proben mitgeführt. Pro Messung wurden 2×10^5 bis 4×10^5 Zellen/ml eingesetzt.

Die Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 ml pro \varnothing 32mm Zellkulturschale) 5 min bei 37°C inkubiert und nach dem Ablösen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Das Trypsin wurde durch Zusatz von konditioniertem Kultivierungsmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugierröhrchen überführt und 10 min bei 107 x g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 1,55 ml Fluoreszenzfarbstoff Hoechst-33258 (16 μ g/ml in 80 % Ethanol (v/v) in PBS), einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, welcher spezifisch an Adenosin-Thymidin-Basenpaare der DNA bindet. Die Proben wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem Flußzytometer PASII (Partec GmbH, Münster). Mit dem Programm ‚Multi-cycle‘ (Phenix Flow Systems, Inc.) wurden die G_0/G_1 , G_2 und S-Phasenanteile berechnet und graphisch dargestellt.

5.1.12 Herstellung der Zell-Lysate

5.1.12.1 Gesamtproteinlysate

Die Extraktion der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde in Anlehnung an Lämmli (Lämmli 1970) durchgeführt. Nach dem Entfernen des Kulturmediums und dem Waschen mit PBS wurden Zellen mit 2-fachem Lämmli-Puffer (100 mM Tris-HCL pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol) überschichtet und mit einem Zell-Kratzer von der Oberfläche des Schälchens abgelöst. Die gewonnenen Lysate wurden 10-mal durch eine 20 G Kanüle gezogen, 10 min bei 100°C erhitzt und anschließend 10 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Im Überstand enthaltene Proteine wurden bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt und das Sediment mit Zelltrümmern verworfen.

5.1.12.2 Fraktionierte Zelllyse nach Arva et al. 2005

Die Durchführung der Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an Arva et al. (2005). Mit dieser Methode erfolgte die getrennte Extraktion von zytoplasmatischen und löslichen nukleären Proteinen. Durch anschließende Behandlung der DNA mit DNase wurden Chromatin-gebundene Proteine extrahiert.

Die Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 ml pro Ø 32mm oder 5 ml für Ø 150 mm Zellkulturschale) auf Eis 3 min inkubiert und durch mehrmaliges Pipettieren abgelöst und vereinzelt. Das Inaktivieren des Trypsins erfolgte durch Zusatz von Kultivierungsmedium (2 ml oder 15 ml). Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugierröhrchen überführt und 10 min bei 107 x g und 4°C sedimentiert. Das Zellsediment wurde 2-mal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend jeweils 10 min bei 107 x g und 4°C sedimentiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 5-fachen Volumen von hypotonischen Puffer A (10 mM Hepes pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM AEBSF, 0,5 mM DTT, 2 µg/ µl Leupeptin und Proteinaseinhibitor Cocktail Complete von Roche) erfolgte die Inkubation mit 2-fachen Volumen an Puffer A auf Eis. Die Zellen wurden 10 min bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand enthaltenen zytoplasmatischen Proteine wurden entnommen. Das verbleibende Sediment wurde mit eiskaltem Puffer C mit hoher Salzkonzentration (20 mM Hepes pH 7,9, 20 % Glycerol (v/v), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM EDTA, 0,2 mM AEBSF, 0,5 mM DTT, 2 µg/µl Leupeptin und Proteinaseinhibitor Cocktail Complete von Roche) versetzt, bis eine Konzentration von 40 x 10⁶ Zellen/120 µl Puffer erreicht wurde und mit 20 G Kanüle resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 30 min bei 4°C geschüttelt und anschließend 30 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt lösliche nukleäre Proteine. Im Sediment enthaltenes Chromatin wurde in einer DNase I Lösung (10⁸ Zellen/ml; 20 mM NaCl, 0,1 mM AEBSF, 200 units DNase I /10⁷ Zellen) resuspendiert und mit einem 2-fachen DNase-Verdau-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, Protease Inhibitor Cocktail Complete von Roche; 10⁸ Zellen/ml) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Suspension bei 14000 x g für 1 min (4°C) zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die während des DNase I Verdau abgelösten chromatin-gebundenen Proteine. Das Sediment wurde in 70 µl 2 x Laemmli Puffer (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin) zur Überprüfung der Effektivität des DNase I Verdau aufgenommen. Alle gewonnenen Zelllysate wurden bei – 80°C gelagert.

5.1.12.3 Fraktionierte Zelllyse nach Nuclear Complex Co-IP Kit

Eine weitere Methode der fraktionierten Zelllyse bietet das Nuclear Complex Co-IP Kit von Active Motif. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Angaben der Puffer gelten für 8,8 x 10⁶ Zellen. Die Zellen wurden mit eiskalter PBS/Phosphatase-Inhibitor-Lösung gewaschen, mit einem weichen Zellkratzer von der Oberfläche abgelöst und in ein Zentrifugierröhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 200 x g zentrifugiert und in 500 µl eines hypotonischen Puffers resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 25 µl von einem mitgelieferten Detergent und drei- bis fünfmaliges Mischen. Die Suspension wurde 30 s bei 14 000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische und im Pellet befand sich die nukleäre Fraktion. Das Pellet wurde in 100 µl Verdau-Puffer resuspendiert und mit 0,5 µl enzymatischem Verdau-Cocktail versetzt. Nach 90 min Inkubation bei 4°C erfolgte das Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 2 µl von 0,5 M EDTA und einer Inkubation von 5 min auf Eis. Die Suspension wurde 10 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt nukleäre lösliche und Chromatin-gebundene Proteine.

5.1.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford (Bradford M.M., 1976) mittels Roti-Quant Assay (Boehringer-Mannheim) durchgeführt. Der Bradford-Nachweis beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Commassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, sobald dieser Farbstoff an Proteine in Lösung bindet. Die Proben wurden entsprechend der Nachweisempfindlichkeit des Assays verdünnt. Zu 50 µl Proteinlösung wurden 200 µl Bradfordlösung gegeben. Es folgte eine Inkubation dieses Ansatzes für 5 min bei RT. Die Extinktion wurde bei 570 nm in einem ELISA-Reader (ELX 800, Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall) ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichgerade mit BSA bekannter Konzentration.

5.1.14 Immunpräzipitation von p53

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung der entsprechenden Proteine bzw. Proteinkomplexe ermöglicht. Für die Immunpräzipitation von p53 wurde ein käuflicher, an Agarose-Matrix kovalent gekoppelter Antikörper verwendet.

5.1.14.1 Immunpräzipitation in Anlehnung an Carbone et al. (2002)

Für die Immunpräzipitation wurden 0,7 mg Protein eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit E1A-Puffer (250 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,0, 0,1 % (v/v) NP40, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) aufgefüllt und mit 1,6 µg des an Agarose-Beads gekoppelten p53 Antikörpers bei 4°C 4,5 h oder über Nacht inkubiert und langsam auf einem Kipp-Schüttler bewegt. Anschließend wurden die Antikörper-Beads-Proteine-Komplexe 2 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Antikörper-Beads-Proteine-Komplexe mit 1 ml E1A-Puffer versetzt und 30 min bei 4°C langsam auf einem Kipp-Schüttler bewegt. Diese Waschprozedur wurde insgesamt 4-mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads-Antikörper-Protein-Komplexe 2 min bei 1000 x g abzentrifugiert und das p53-Protein und seine potentielle Bindepartnern durch Veränderung des pH-Wertes vom Antikörper-Matrix-Komplex gelöst.

5.1.14.2 Immunpräzipitation mit Nuclear Komplex Kit

Für die Immunpräzipitation von p53 mit dem Nuclear Komplex Kit (Active Motif, Rixensart, Belgien) wurden 0,5 mg Protein und 3 µg des an Agarose-Beads gekoppelten p53 Antikörpers angesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte nach Angaben des Herstellers und es wurden unterschiedliche im Kit verfügbare Puffer (mit niedriger und hoher Salzkonzentration) verwendet. Im Anschluß wurde das p53-Protein mit seinen potentiellen Bindepartnern durch Veränderung des pH-Wertes vom Antikörper-Matrix-Komplex gelöst.

5.1.14.3 Lösen des p53-Proteins mit Bindepartnern vom p53 Antikörper-Agarosematrix-Komplex durch pH-Veränderung

Das p53-Protein mit seinen potentiellen Bindepartnern wurde durch Veränderung des pH-Wertes vom Antikörper-Matrix-Komplex gelöst. Dies erfolgte durch Zugabe von 20 µl 0,1 M Glycin pH 2,5 zu den Beads-Antikörper-Protein-Komplexen. Nach 10 min Inkubation wurde die Suspension 2 min bei 1400 x g abzentrifugiert und das im Überstand vorliegende p53-Protein mit potentiellen Bindepartnern abgenommen. Dieser Überstand wurde mit 2 µl Tris-HCl pH 7,6 neutralisiert und anschließend in Ladepuffer für die Gelelektrophorese auf-

genommen und bei -80°C eingefroren. Die gesamte Prozedur wurde mit dem Sediment wiederholt und diese Eluate elektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.15 Western-Blot-Analyse

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die SDS-PAGE erfolgte als vertikale Flachbett-Elektrophorese in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach dem Prinzip von Lämmli (Laemmli U.K. 1970) und ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS denaturiert Proteine, wobei die durch elektrostatische Kräfte zusammengehaltene Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten zerlegt werden. SDS überdeckt als anionisches Detergenz die Eigenladungen der Proteine, wodurch Micellen mit konstanter Ladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein). Nach der Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden diese durch das Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und fixiert. Die gesuchten Proteine können dann mit spezifischen Antikörperreaktionen detektiert werden.

5.1.15.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte im System Bio-Rad „Mini-Protean II“. Für die Auftrennung von Proteinen der Molmasse von 10 bis 70 kDa ist ein 12%-iges Polyacrylamid-Trenngel geeignet. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glassplatten (Gelfläche: 7 cm x 8 cm), die einen Abstand von 1 mm hatten, gegossen. Um das Austrocknen des Gel zu verhindern und die Entstehung einer planen Oberfläche zu unterstützen, wurde das Trenngel während der Polymerisation (ca. 1 h) mit H_2O überschichtet. Anschließend wurde das Wasser entfernt und das 3,2%-ige Polyacrylamid-Sammelgel gegossen und ein Kamm mit 3 mm breiten Taschen eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammlgels (ca. 1 h) wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Apparatur platziert. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Probenpuffer reduziert (in einem Volumenverhältnis 1:2) mit dem Laufpuffer versetzt und 5 min bei 80°C denaturiert. Es wurden jeweils 15 μg Gesamtproteinmenge geladen. Als Molmassenstandard wurde „Full range rainbow protein molecular weight marker“ (10 bis 250 kDa, von Amersham) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte 3 h bei 16 mA (34-50 V).

5.1.15.2 Blotten der Proteine

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Immobilon-P; Millipore) wurde das Nassblot-System 'Mini Trans-Blot' von Bio-Rad verwendet. Die Membran wurde vor der Verwendung kurz in Methanol inkubiert, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und dann 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Beenden der Elektrophorese wurde das Trenngel kurz im Transferpuffer äquilibriert, auf ein angefeuchtetes 3 MM Whatman-Papier gelegt und mit der äquilibrierten Membran, sowie einem angefeuchteten 3 MM Whatman-Papier luftblasenfrei zugedeckt. Dieses „Sandwich“ wurde in der Apparatur in einer Kassette platziert. Der Tank wurde mit dem Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte unter einer Spannung von 20 V (100-80 mA) 14 h bei 4°C .

Nach dem Beenden des Transfers wurde die Membran für eine Immundetektion der Proteine eingesetzt. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung 4 h bei RT inkubiert und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung-Lösung 4 h bei RT entfärbt.

5.1.15.3 Auftrennen und Blotten der Proteine im NuPAGE-System

Für die gleichzeitige Auftrennung von Proteinen, deren Größen zwischen 230 und 14 kDa lagen, wurde das Fertiggel-System NuPAGE von Invitrogen verwendet. Eingesetzt wurden 4-12 % Bis-Tris Novex Gradientengele und nach Angaben des Herstellers wurden die Proteinlysate in der NuPAGE Gelkammer unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet.

5.1.15.4 Nachweis der Proteine durch Immundetektion

Die Membran wurde 10 min in TBST gewaschen. Die Absättigung der freien Proteinbindungsstellen der Membran erfolgte über Nacht bei 4 °C mit fettfreier Milchpulverlösung (5 % (w/v) in TBST). Die Antikörperinkubation erfolgte in einer Feuchtkammer. Die Membran wurde mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Milchpulverlösung (5 % (w/v) in TBST), 2 h bei RT inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurde die Membran anschließend dreimal 10 Min in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte 1 h bei RT in einer Feuchtkammer. Als Zweitantikörper wurden mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper verdünnt in Milchpulverlösung (5 % (w/v) in TBST) verwendet. Anschließend wurde die Membran sechsmal 10 min in TBST gewaschen und 5 min bei RT mit Peroxid (ECL-Plus; Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers inkubiert. Bei der enzymatischen Umwandlung entsteht zuerst ein Acridinester, der mit Peroxid unter alkalischen Bedingungen in ein angeregtes Zwischenprodukt umgewandelt wird, welches unter Abgabe von Licht zerfällt. Die Chemolumineszenzsignale wurden auf einem Hyperfilm ECL für Chemolumineszenz (Amersham) und Expositionszeiten zwischen 0,5 und 30 min detektiert.

Um eine anschließende Detektion der Membran mit einem anderen Antikörper zu ermöglichen, erfolgte zuerst die Entfernung der gebundenen Antikörper von der Membran. Hierfür wurde die Membran 30 min bei 50°C im Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 2 % (w/v) SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) inkubiert und anschließend mehrfach in TBST gewaschen, bevor sie für eine erneute Immundetektion eingesetzt wurde.

5.1.16 Präparation von Plasmid-DNA für die Expression in Zelllinien

5.1.16.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Plasmide wurden in *Escherichia coli* vermehrt. Kompetente *E. coli* Bakterien 50 µl (DH5α von Life Technologies, Gaithersburg, USA) wurden nach Angaben des Herstellers mit 1-10 µg Plasmid-DNA transformiert. Die Bakterien wurden in einer Eis/Ethanol-Mischung aufgetaut und mit Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 sec, 42°) wurden die Zellen für 1 h in LB-Medium (Lennox, Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 37 °C im Schüttler regeneriert, auf Nährböden (Luria Bertani Agar; Lennox, Roth, Karlsruhe, Deutschland) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit ausgewählten Klonen wurden Flüssigkulturen angeimpft und bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde das Antibiotikum Ampicillin (50 µg/µl) oder Kanamycin (50 µg/µl) dem Medium zugegeben.

5.1.16.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Die Präparation von DNA im Midi- und Maximaßstab erfolgte mit dem QIAGEN Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Zellen aus 250 oder 500 µl Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation pelletiert (6000 x g, 15 min, 4 °C) und unter

Verwendung des mitgelieferten Puffers lysiert. Die Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte an Anionenaustauschersäulen. Die verwendeten p53-Plasmide werden in einer niedrigen Kopienanzahl von Bakterien repliziert und wurden im Maxi-Maßstab angereichert und gereinigt.

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Die Messung erfolgte im BioPhotometer (Eppendorf).

5.1.16.3 Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese der aufgereinigten Plasmide

Die Überprüfung der Plasmide erfolgte mittels Restriktionsverdau und anschließender Analyse der Fragmente durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 M EDTA, pH 8,0) gelöst. Zum Auftragen wurden die Proben mit einem fünffachen Gelbeladepuffer (5 % (v/v) Glycerin, 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau in 0,5 x TBE) gemischt. Die Auftrennung erfolgte bei 70 V und 65-85 mA über einen Zeitraum von 1 h.

5.2 Materialien

5.2.1 Zell-Linien

Folgende Zell-Linien wurden in der durchgeführten Arbeit verwendet. Diese wurden, wie in der Tabelle angegeben gekauft oder freundlicherweise von genannten Laboren zur Verfügung gestellt.

Zell-Linien		Bezugsquelle
Normale humane Vorhautfibroblasten AG1522C		Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA)
Ataxia telangiectasia (AT) Fibroblasten	GM2052D	Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA)
	AT1BR (BM20)	European Collection of Cell Cultures
humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 mit Wildtyp p53 (p53 ^{+/+}) und HCT116 (p53 ^{-/-})		B. Vogelstein (Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, USA)
Humane Osteosarcoma-Zelllinien U-2OS (wt p53) und Saos-2 (p53 neg)		ATTC-LGC Promchen (London, UK)
H1299		ATTC-LGC Promchen (London, UK)
U2OS Zellen mit stabiler Expression von 53BP1		J. Bartek (Institute of Cancer Biology and Centre of Genotoxic Stress Research, Copenhagen, DK)
Humane Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom HeLa		M. Lavin (Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia)
HeLa Zellen mit stabil exprimierten H2B-GFP		D. Zink (Universität München)
Prostata-Krebszellen aus Ratte (aus dem Kopenhagen-System) mit der Bezeichnung R-3327-AT-1		ATCC-Zellbank (Johns Hopkins University, Ort, USA)
Spontan immortalisierte embryonale Maus-Fibroblasten MEF mit wt p53 (+/+) und p53 (-/-)		B. Kaina (Universität Mainz)
Spontan immortalisierte embryonale Maus-Fibroblasten MEF mit wt PARP und PARP (-/-)		G. de Murcia (Universität Louis Pasteur, Strassburg, Frankreich)

5.2.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Humane Fibroblasten wurden mit gebrauchsfertigem Kulturmedium EMEM (BioWhittaker) mit 20% (v/v) FCS (Biochrom), 1% (v/v) L-Glutamin (Biochrom) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom) kultiviert. Die Zelllinien wurden im Kulturmedium mit 10% (v/v) Glycerin eingefroren. Die Kultivierung der humanen Kolonkarzinomzellen erfolgte im gebrauchsfertigen McCoy's 5A Medium (Sigma) mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) L-Glutamin und 1% (v/v) Geneticin G418. Das Antibiotikum diente der Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks. Die Zelllinien wurden im Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO eingefroren. Für alle Zelllinien wurde eine 0,05 g/l Trypsin, 1 g/l EDTA-Lösung in PBS ohne Magnesium und Calcium (PAN) verwendet.

5.2.3 Lösungen für Experimente

Lösungen	
Ladepuffer für Agarosegele	5 % (v/v) Glycerol, 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau in 0,5 x TBE
BSA-Lösung für IF	0,5% (w/v) BSA in PBS
Milchpulver-Lösung für WB	5 % (w/v) fettfreien Nestlé-Milchpulver in 1 x TBST
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg/ml EtBr in H ₂ O _{dest.}
Hepes-Extraktionspuffer	10 mM Hepes-KOH, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM Dithiothreitol, 0,1 % (v/v) Triton X-100; pH 7,9, eingestellt mit 1 M KOH
'Cytoskeleton Buffer'	10 mM Pipes pH 6,8, 100 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 3 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, 0,5 % Triton X-100
'Cytoskeleton Stripping Buffer'	10 mM Tris-Base, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl ₂ , 1 % Tween 40, 0,5 % Na-desoxycholate, pH 7,4
'Modified Streck Tissue Fixative'	150 mM 2-Bromo-1-nitro-1,3-propandiol, 108 mM Diazolidinylurea, 10 mM Na-Citrat, 50 mM EDTA, pH 5,7
Permeabilisations-Lösung für IF	0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS
Paraformaldehyd-Fixierungs-Lösung für IF	2% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
TOPRO-3 Lösung	1 µM TO-PRO 3 in PBS
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) –Lösung	1 µM DAPI in PBS
Propidiumiodid-Lösung	1 µM Propidiumiodid und 100 µg/ml RNase A in PBS
Hoechst-33258-Lösung	16 µg/ml Hoechst-33258 in Ethanol 80% (v/v) und PBS 20% (v/v)
2 x Lämmli-Proben-Puffer	2 fachen Lämmli-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin) überprüfen
Puffer A für fraktionierte Proteinextraktion	10 mM Hepes pH 7,9, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,5 mM AEBSF, 0,5 mM DTT, 2µg/ µl Leupeptin und Proteinaseinhibitor Cocktail Complete von Roche
Puffer C für fraktionierte Proteinextraktion	20 mM Hepes pH 7,9, 20% Glycerol (v/v), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 1,5 mM EDTA, 0,2 mM AEBSF, 0,5 mM DTT, 2µg/ µl Leupeptin und Proteinaseinhibitor Cocktail Complete von Roche
DNase I Lösung	20 mM NaCl, 0.1 mM AEBSF, 200 units DNase I/10 ⁷ Zellen
DNase I-Verdau-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , Protease Inhibitor Cocktail Complete von Roche
SDS-PAGE Laufpuffer nach Lämmli	50 mM Tris-Base pH 6,8, 0,38 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE Ladepuffer nach Lämmli	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,02 mg/ml Bromphenolblau, 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Sammelgel (pH 6,8)	3,2% (v/v) Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1), 0,35 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,05% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
SDS-PAGE-Trenngel (pH 8,8)	12% (v/v) Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1), 0,35 M Tris-HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,05% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 2 % (w/v) SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol
1 x TBST (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20
10 x TE (pH 8,0)	0,1 M Tris-Base, 0,01 M EDTA

SDS-PAGE Transferpuffer	20% Methanol, 0,02 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,15 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Methylenblau-Lösung für Überlebenskurven	30 % (v/v) Loeffler's Methylenblaulösung, 0,001 % (v/v) KOH, 5 % Methanol
E1A-Puffer	250 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,0, 0,1 % (v/v) NP40, 5 mM EDTA, 1 mM DTT

5.2.4 Antikörper

Primärantikörper	Eigenschaften und Bezugsquelle
53BP1 2 mg/ml	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: gesamtes Protein, Verdünnung: IF: 1: 500 von Oncogene
53BP1 200 µg/ml	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: gesamtes Protein, Verdünnung: WB 1: 2000 von Alexis
CENP-F (Ab-5) 2,5 mg/ml	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: C-Terminus, IF: 1:750 von Abcam
Cip1/Waf 21 (p21) 250 µg/ml	monoklonaler Maus-Ak., Epitop: gesamtes Protein, Verdünnung IF: 1:80, WB:1:4000 von Transduction Laboratories,
hMre11 Serum	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: gesamtes Protein, IF: 1:300 von Novus biologicals
Ig-G	Maus Ig-G hergestellt in Schaf, Verdünnung 1:10 000
Ig-G	Kaninchen Ig-G hergestellt in Schaf, Verdünnung 1:10 000
p53	monoklonaler Maus-Ak. IF: 1:50 von Dr. Ch. Blattner (Karlsruhe)
p53 (Ab-6) 100 µg/ml	monoklonaler Maus-Ak., Epitop:AS 21-25, Verdünnung IF: 1:50, WB:1:2000 von Oncogene
p53 (FL393) 200 µg/ml	polyklonaler Ziegen-Ak., Epitop: gesamtes Protein, Verdünnung IF: 1:100, WB:1:1000 von Santa Cruz
p53 (FL393) konjugiert an Agarosebeads 200 µg/ml	polyklonaler Ziegen-Ak., Epitop: gesamtes Protein für Immunpräzipitation von Santa Cruz
Phospho H2A.X (Ser 139)	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: Histon H2AX phosphoryliert an Ser 139, Verdünnung IF: 1:200, WB:1:1000 Upstate
Phospho H2A.X (Ser 139) 1 mg/ml	monoklonaler Maus-Ak., Epitop: Histon H2AX phosphoryliert an Ser 139, Verdünnung IF: 1:200, WB:1:1000 von Upstate
Phospho-p53(Ser15) (Ab-3)	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: am Ser 15 phosphoryliertes p53, IF: 1:500, WB: von Oncogene
Phospho-p53(Ser15) (16G8)	monoklonaler Maus-Ak., Epitop: an Ser 15 phosphoryliertes p53, WB: 1:1000 von Cell Signaling
PML (PG-M3) sc-966 200 µg/ml	monoklonaler Maus-Ak., Epitop:AS 37-51, Verdünnung IF: 1:300, von Santa Cruz
α-Tubulin	monoklonaler Maus-Ak., Epitop: C-Terminus, Verdünnung: WB: 1:4000 von Sigma
β-Aktin	polyklonaler Kaninchen-Ak., Epitop: N-Terminus, Verdünnung: WB: 1:500 von Sigma

Sekundärantikörper	Spezifikation, Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 markierter F(ab') ₂ Fragment von markierter Ziege-anti-Maus - F(ab') ₂ -IgG (H+L)-Fragment 2 mg/ml	Polyklonaler Ziege-Ak., Verdünnung IF: 1:400 von Molecular Probes
Alexa Fluor 488 markierter F(ab') ₂ -IgG-Fragment-Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) 2 mg/ml	Polyklonaler Esel-Ak., Verdünnung IF: 1:400 von Molecular Probes
Alexa Fluor 568 -Esel-anti-Ziege IgG (H+L) 2 mg/ml	Polyklonaler Esel-Ak., Verdünnung IF: 1:400 von Molecular Probes
Alexa Fluor 568 markierter F(ab') ₂ -IgG-Fragment-Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) 2 mg/ml	Polyklonaler Ziege-Ak., Verdünnung IF: 1:400 von Molecular Probes
Anti-Kaninchen IgG konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)	Serum, Amersham Biosciences
Anti-Maus IgG konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)	Serum, Amersham Biosciences

5.2.5 Plasmide und Bakterienstämme

Plasmide	Charakteristika
pSV53her	wildtyp p53
pSV53(1-363)her	p53 mit deletierter regulatorischer Domäne
pSV53(1-333)her	p53 mit deletierter regulatorischer und Tetramerisierungs-Domäne
pSV53(174Y)her	p53 mit Mutation in der Transkriptions-aktivierenden Domäne
pSV53(15A)her	p53 mit Mutation an Ser15
Induzierbarkeit	nach der Transfektion erfolgt die Induktion der Transkription der genannten Plasmide durch Zugabe von 200 nm β-Östradiol
Bezugsquelle	Die Plasmide wurden freundlicherweise von L. Wiesmüller (Universitätsfrauenklinik, Ulm) zur Verfügung gestellt.



Abbildung 65. Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des p53 Proteins.

Das p53 Protein wird in fünf Domänen unterteilt: Transaktivierungsdomäne (1-42), prolinreiche Domäne (63-97), spezifische DNA-Bindedomäne (102-292), die Tetramerisierungsdomäne (325-355) und die regulatorische Domäne (360-393).

Plasmide und siRNA	Bezugsquelle
p-Silencer 3.1-H1 Hygro-Vektor	Ambion Applied Biosystems, Forster City, USA
53BP1 siRNA im p-Silencer 3.1-H1 Hygro Vektor 5'-GCCAGGTTTCAGAGAZGATTCAAGAGAA ATCATCCTCTAGAACCTGGCTTTTTTGGAAA-3'	Ambion Applied Biosystems, Forster City, USA Sequenz für siRNA von Qiagen, Hilden, Deutschland
kontroll siRNA	Ambion Applied Biosystems, Forster City, USA

Bakterien	Bezugsquelle
DH5 α	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

5.2.6 Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
Alexa 488 Zenon Mouse IgG Labeling Kit	Molecular Probes
Bradford Assay Rothi-Quant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham, Buckinghamshire, UK
Lowry Assay "DC Protein Assay"	Bio-Rad, CA, USA
Maxi-Kit Qiagen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mycoplasma Detecion Kit	Boehringer Mannheim, Deutschland
Nuclear Complex CoIP Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien

5.2.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Wenn im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma, Merck und AppliChem, Zellkulturmaterialien von den Firmen Falcon, Gibco BRL und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner, Roth und Eppendorf bezogen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
ECL Plus TM	Amersham Bioscience
FuGENE 6	Roche, Basel, Schweiz
Größen-Marker für DNA	Fermentas
Größen-Marker für Proteine : „Full range rainbow protein molecular weight marker´10-250 kDa“	Amersham, Buckinghamshire, UK
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS: Dulbecco`s PBS w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Dulbecco, Pasching, Österreich
Polyvinylidenfluorid-Membran Immobilion-P	Millipore, Billerica, MA, USA
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK

Zubehör für mikroskopische Präparate	Bezugsquelle
Deckgläser (verschiedene Größen)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettmittel Vectashield Mounting Medium	Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA
Immersionsöl	Zeiss

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav Varioklav	H+53BP1-GFP Labortechnik GmbH
Dosimeter SN4	PTW Freiburg, Deutschland
Durchflusszytometer Pas III Particle Analysis System	Partec
Einschweißgerät	
Entwicklerautomat M35 X-OMAT Processor	Kodak
Heizblock	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Hybridisierer 600Eppendorf Tischzentrifuge	StratageneEppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus
Mikroskop für die konfokale Aufnahmen	konfokalen Laserscanning System Leica TCS, ausgestattet mit inversem Mikroskop DM IRBE (Objektiv: PlanApo 63x / 1,32 Öl), Argon-Krypton Laser und einem computergesteuerten Kreuztisch Märzhäuser SCAN 100x100
Mikroskop für die Beobachtung der lebenden Zellen	Mikroskop Leica DM IRE 2 ausgestattet mit einer PCO Sensicam Kamera (PCO AG, Kelheim, Deutschland) und einer Zellkammer mit Zubehör von Bioprotech (Butler, USA).
pH-Meter	766 Calimatic von Knick
Magnetrührer	Stuart Heat-Stir
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Bioscience
Röntgenröhre Isovolt DS1, Typ IV320-13	Seifert, Ahrensburg, Deutschland
Schüttler Unimax 1010Zentrifuge	Heidolph, Schwabach, Deutschland
SDS PAGE System „Mini Protean II“	Bio-Rad, CA, USA
Spannungsregler Consort E844Zentrifuge	BioRad
Stereomikroskop	Zeiss
Sterilisator Heißluft	Heraeus Instruments
Sterilwerkbänke	HeraSafe von Heraeus
Stickstoffbehälter Locator 8 Plus	Thermolyne
Tank-Blot System “Mini Trans Blot”	Bio-Rad, CA, USA
Tischautoklave Typ 17	Melag
Wasserbad Julabo SW 20	Julabo Labortechnik
Zell-Zähler Z2 Coulter Counter	Beckman Coulter, Krefeld, Germany
Zentrifugen	Sigma Zentrifuge; Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland Tischzentrifuge von Fischerbrand Biofuge fresco von Heraeus Sorvall RC-5B von DuPont Instruments

5.2.8 Software

Software	Bezugsquelle
Excel 2000, 2003	Micorsoft Corporation (Redmond, USA)
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging BV, Hilversum, Niederlande
Image J 1.29	rsb.info.nih.gov/ij/
Image Pro Plus	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
Origin 7G SR1	OriginLab Corporation, Northampton, MA USA
Photoshop 6,7	Adobe, Unterschleißheim
Scion Image	Scion Corporation, Frederick, Maryland (USA), http://www.scioncorp.com/pages/download_now.asp
Word 2000, 2003	Micorsoft Corporation (Redmond, USA)
Berechnung der Poisson-Verteilung	http://faculty.vassar.edu/lowry/poissonfit.html .

Literaturverzeichnis

Adams, J., Adler, C., Ahammed, Z., Allgower, C., Amonett, J., Anderson, B. D. et al. Three-pion Hanbury Brown-Twiss correlations in relativistic heavy-ion collisions from the STAR experiment. *Phys. Rev. Lett.* 91 (26 Pt 1), 262301, 2003.

Aguilar-Quesada, R., Munoz-Gamez, J. A., Martin-Oliva, D., Peralta, A., Valenzuela, M. T., Matinez-Romero, R. et al. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC. Mol. Biol.* 8, 29, 2007.

Al Rashid, S. T., Dellaire, G., Cuddihy, A., Jalali, F., Vaid, M., Coackley, C. et al. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res.* 65 (23), 10810-10821, 2005.

Altaf, M., Saksouk, N. und Cote, J. Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat. Res.* 618 (1-2), 81-90, 2007.

Altman KI., Gerber GB., Okada S. *Radiation Chemistry, vol I: cells.* Academic Press, New York, 1970

Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, F., Garcia-Villa, E. und Gariglio, P. p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1446 (3), 181-192, 1999.

Arney, K. L. und Fisher, A. G. Epigenetic aspects of differentiation. *J. Cell Sci.* 117 (Pt 19), 4355-4363, 2004.

Arva, N. C., Gopen, T. R., Talbott, K. E., Campbell, L. E., Chicas, A., White, D. E. et al. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *J. Biol. Chem.* 280 (29), 26776-26787, 2005.

Ataian, Y. und Krebs, J. E. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem. Cell Biol.* 84 (4), 490-504, 2006.

Aten, J. A., Stap, J., Krawczyk, P. M., Van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J. et al. Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303 (5654), 92-95, 2004.

Aufderheide, E., Rink, H., Hieber, L. und Kraft, G. Heavy ion effects on cellular DNA: strand break induction and repair in cultured diploid lens epithelial cells. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* 51 (5), 779-790, 1987.

Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P. et al. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res.* 23 (3), 362-369, 1995.

Bakkenist, C. J. und Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421 (6922), 499-506, 2003.

Banath, J. P., MacPhail, S. H. und Olive, P. L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 64 (19), 7144-7149, 2004.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410 (6824), 120-124, 2001.

Bassing, C. H. und Alt, F. W. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 3 (2), 149-153, 2004.

Bassing, C. H., Chua, K. F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S. R., Fleming, J. C. et al. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99 (12), 8173-8178, 2002.

Bassing, C. H., Suh, H., Ferguson, D. O., Chua, K. F., Manis, J., Eckersdorff, M. et al. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* 114 (3), 359-370, 2003.

Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M. B., Bartek, J. et al. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* 173 (2), 195-206, 2006.

Belmont, A. S. und Bruce, K. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.* 127 (2), 287-302, 1994.

Belmont, A. S., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W. und Agard, D. A. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma* 98 (2), 129-143, 1989.

Berezney, R. und Coffey, D. S. The nuclear protein matrix: isolation, structure, and functions. *Adv. Enzyme Regul.* 14, 63-100, 1976.

Bergink, S., Salomons, F. A., Hoogstraten, D., Groothuis, T. A., de, W. H., Wu, J. et al. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev.* 20 (10), 1343-1352, 2006.

Bewersdorf, J., Bennett, B. T. und Knight, K. L. H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103 (48), 18137-18142, 2006.

Blasina, A., Price, B. D., Turenne, G. A. und McGowan, C. H. Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr. Biol.* 9 (19), 1135-1138, 1999.

Böcker, W. und Iliakis, G. Computational Methods for analysis of foci: validation for radiation-induced gamma-H2AX foci in human cells. *Radiat. Res.* 165 (1), 113-124, 2006.

Boisvert, F. M., Hendzel, M. J. und Bazett-Jones, D. P. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* 148 (2), 283-292, 2000.

Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C. et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS. Biol.* 3 (5), e157, 2005.

Bouquet, F., Muller, C. und Salles, B. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5 (10), 1116-1122, 2006.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J. M., Mahy, N. L., Ellis, J. A. und Bickmore, W. A. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10 (3), 211-219, 2001.

Bragg and Kleemann 1905 On the α -Particles of Radium and their loss of Range in Passing Through Various Atoms and Molecules, *Phil. Mag.* (1905), 10, 318-340

Bressan, D. A., Vazquez, J. und Haber, J. E. Mating type-dependent constraints on the mobility of the left arm of yeast chromosome III. *J. Cell Biol.* 164 (3), 361-371, 2004.

Bridger, J. M., Boyle, S., Kill, I. R. und Bickmore, W. A. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr. Biol.* 10 (3), 149-152, 2000.

Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y. et al. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 15 (24), 3286-3295, 2001.

Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. und Chen, D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276 (45), 42462-42467, 2001.

Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K. et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281 (5383), 1677-1679, 1998.

Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S. und Pelicci, P. G. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 21 (11), 1633-1640, 2002.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A. et al. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* 5 (7), 675-679, 2003.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A. et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296 (5569), 922-927, 2002.

Chaly, N. und Brown, D. L. The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis. *J. Cell Sci.* 91 (Pt 3), 325-335, 1988.

Chen, H. T., Bhandoola, A., Difilippantonio, M. J., Zhu, J., Brown, M. J., Tai, X. et al. Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290 (5498), 1962-1965, 2000.

Ching, R. W., Dellaire, G., Eskiw, C. H. und Bazett-Jones, D. P. PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J. Cell Sci.* 118 (Pt 5), 847-854, 2005.

Chuang, C. H., Carpenter, A. E., Fuchsova, B., Johnson, T., de, L. P. und Belmont, A. S. Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr. Biol.* 16 (8), 825-831, 2006.

Chubb, J. R., Boyle, S., Perry, P. und Bickmore, W. A. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr. Biol.* 12 (6), 439-445, 2002a.

Comings, D. E. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am. J. Hum. Genet.* 20 (5), 440-460, 1968.

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. und Elledge, S. J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294 (5547), 1713-1716, 2001.

Costes, S. V., Boissiere, A., Ravani, S., Romano, R., Parvin, B. und Barcellos-Hoff, M. H. Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts. *Radiat. Res.* 165 (5), 505-515, 2006.

Costes, S. V., Ponomarev, A., Chen, J. L., Nguyen, D., Cucinotta, F. A. und Barcellos-Hoff, M. H. Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *PLoS. Comput. Biol.* 3 (8), e155, 2007.

Craig, J. M. und Bickmore, W. A. Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays* 15 (5), 349-354, 1993.

Crawford, L. The 53,000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 25, 1-50, 1983.

Cremer T., Baumann H., Nakanishi K., Cremer C. Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments. *Chromosomes Today* 8: 203-12

Cremer, T. und Cremer, C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* 2 (4), 292-301, 2001.

Cremer, T. und Cremer, C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur. J. Histochem.* 50 (3), 161-176, 2006a.

Cremer, T. und Cremer, C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur. J. Histochem.* 50 (4), 223-272, 2006b.

Cremer, T., Cremer, C., Baumann, H., Luedtke, E. K., Sperling, K., Teuber, V. et al. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum. Genet.* 60 (1), 46-56, 1982.

Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Muller, S., Solovei, I. und Fakan, S. Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (3), 307-316, 2006.

Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. und Bickmore, W. A. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145 (6), 1119-1131, 1999.

Csink, A. K. und Henikoff, S. Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 143 (1), 13-22, 1998.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. und Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342 (Pt 2), 249-268, 1999.

Daniel, R., Ramcharan, J., Rogakou, E., Taganov, K. D., Greger, J. G., Bonner, W. et al. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J. Biol. Chem.* 279 (44), 45810-45814, 2004.

D'Anjou, H., Chabot, C. und Chartrand, P. Preferential accessibility to specific genomic loci for the repair of double-strand breaks in human cells. *Nucleic Acids Res.* 32 (20), 6136-6143, 2004.

Davie, J. R. The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int. Rev. Cytol.* 162A, 191-250, 1995.

Dellaire, G. und Bazett-Jones, D. P. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26 (9), 963-977, 2004.

Desai, N., Durante, M., Lin, Z. W., Cucinotta, F. und Wu, H. High LET-induced H2AX phosphorylation around the Bragg curve. *Adv. Space Res.* 35 (2), 236-242, 2005.

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. und Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8 (21), 2540-2551, 1994a.

Dillon, N. und Festenstein, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* 18 (5), 252-258, 2002.

D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S. et al. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 4 (1), 11-19, 2002.

Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N. et al. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* 16 (6), 979-990, 2004.

Downs, J. A., Lowndes, N. F. und Jackson, S. P. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408 (6815), 1001-1004, 2000.

Dundr, M. und Misteli, T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356 (Pt 2), 297-310, 2001.

Earnshaw, W. C. und Laemmli, U. K. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 96 (1), 84-93, 1983.

El-Deiry, W. S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.* 8 (5), 345-357, 1998.

Elsässer T. Biophysik, GSI Darmstadt. Persönliche Mitteilung zu Experimenten mit Tumortherapie-ähnlicher Bestrahlung

Eskiw, C. H., Dellaire, G., Mymryk, J. S. und Bazett-Jones, D. P. Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 21), 4455-4466, 2003.

Espinosa, J. M. und Emerson, B. M. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol. Cell* 8 (1), 57-69, 2001.

Fan, Y., Weinstein, J. N., Kohn, K. W., Shi, L. M. und Pommier, Y. Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J. Med. Chem.* 41 (13), 2216-2226, 1998.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. und Zeiger, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534 (1-2), 65-75, 2003.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. und Bonassi, S. The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428 (1-2), 271-283, 1999.

Han, J., Hendzel, M. J. und Lalunis-Turner, J. Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 165 (3), 283-292, 2006.

Fenteany, G. und Schreiber, S. L. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273 (15), 8545-8548, 1998.

Ferbeyre, G., de, S. E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. und Lowe, S. W. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14 (16), 2015-2027, 2000.

Ferguson, M. und Ward, D. C. Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* 101 (9), 557-565, 1992a.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D., Bonner, W. M. et al. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4 (4), 497-508, 2003.

Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C. und Lamond, A. I. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell Biol.* 139 (7), 1597-1610, 1997.

Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K. et al. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19 (22), 6185-6195, 2000.

Fogh, J., Wright, W. C. und Loveless, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (2), 209-214, 1977.

Foster, E. R. und Downs, J. A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.* 272 (13), 3231-3240, 2005.

Fournier C. Biophysik, GSI Darmstadt. Persönliche Mitteilung zu Mikronuclei-Bildung .

Frankenberg, D., Frankenberg-Schwager, M., Blocher, D. und Harbich, R. Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. *Radiat. Res.* 88 (3), 524-532, 1981.

Fricke, H. und Hart E.J. Radiation Dosimetry, Bd. 2 Academic Press

Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A. et al. 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, 2003.

Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A. et al. 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, 2003.

Gadbois, D. M., Crissman, H. A., Nastasi, A., Habbersett, R., Wang, S. K., Chen, D. et al. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiat. Res.* 146 (4), 414-424, 1996a.

Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P. und Bickmore, W. A. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118 (5), 555-566, 2004.

Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K. und Spann, T. P. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* 16 (5), 533-547, 2002.

Gontijo, A. M., Green, C. M. und Almouzni, G. Repairing DNA damage in chromatin. *Biochimie* 85 (11), 1133-1147, 2003.

Gorisch, S. M., Wachsmuth, M., Toth, K. F., Lichter, P. und Rippe, K. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J. Cell Sci.* 118 (Pt 24), 5825-5834, 2005.

Grant, P. A., Sterner, D. E., Duggan, L. J., Workman, J. L. und Berger, S. L. The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol.* 8 (5), 193-197, 1998.

Grundmann, E. und Stein, P. Studies on the nuclear structure in normal tissues and in carcinoma. *Beitr. Pathol. Anat.* 125, 54-76, 1961.

Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2 (10), 730-736, 2000.

Haaf, T. und Schmid, M. Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 192 (2), 325-332, 1991.

Haber, J. E. und Leung, W. Y. Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (24), 13949-13954, 1996.

Hamada, N., Schettino, G., Kashino, G., Vaid, M., Suzuki, K., Kodama, S. et al. Histone H2AX phosphorylation in normal human cells irradiated with focused ultrasoft X rays: evidence for chromatin movement during repair. *Radiat. Res.* 166 (1 Pt 1), 31-38, 2006.

Han, J., Hendzel, M. J. und Ialunis-Turner, J. Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 165 (3), 283-292, 2006.

Harris, C. C. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262 (5142), 1980-1981, 1993.

Hauptner, A., Krucken, R., Greubel, C., Hable, V., Dollinger, G., Drexler, G. A. et al. DNA-repair protein distribution along the tracks of energetic ions. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 122 (1-4), 147-149, 2006.

Heilmann, J., Taucher-Scholz, G., Haberer, T., Scholz, M. und Kraft, G. Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34 (3), 599-608, 1996.

Heiss, M., Fischer, B. E., Jakob, B., Fournier, C., Becker, G. und Taucher-Scholz, G. Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe. *Radiat. Res.* 165 (2), 231-239, 2006.

Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835), 366-374, 2001.

Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W. et al. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat. Cell Biol.* 4 (1), 1-10, 2002.

Horn, P. J. und Peterson, C. L. Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* 297 (5588), 1824-1827, 2002.

Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J. et al. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432 (7015), 406-411, 2004.

Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R. et al. DNA Damage-Dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics. *Mol. Cell Biol.* 27 (20), 7028-7040, 2007.

Jakob, B., Persönliche Mitteilung zu linearen Spuren von γ H2AX nach Ionenbestrahlung

Jakob, B., Rudolph, J. H., Gueven, N., Lavin, M. F. und Taucher-Scholz, G. Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. *Radiat. Res.* 163 (6), 681-690, 2005.

Jakob, B., Scholz, M. und Taucher-Scholz, G. Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiat. Res.* 159 (5), 676-684, 2003.

Jeggo, P. A. The fidelity of repair of radiation damage. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 99 (1-4), 117-122, 2002.

Jeggo, P. A. DNA breakage and repair. *Adv Genet* 38: 185-217, 1998.

Jenner, T. J., Cunniffe, S. M., Stevens, D. L. und O'Neill, P. Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation. *Radiat. Res.* 150 (5), 593-599, 1998.

Jenner, T. J., Fulford, J. und O'Neill, P. Contribution of base lesions to radiation-induced clustered DNA damage: implication for models of radiation response. *Radiat. Res.* 156 (5 Pt 2), 590-593, 2001.

Jensen, K., Shiels, C. und Freemont, P. S. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20 (49), 7223-7233, 2001a.

Jenuwein, T. und Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* 293 (5532), 1074-1080, 2001.

Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C. P., Okorokov, A. L., Mee, T. et al. p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene* 20 (39), 5449-5458, 2001.

Kanda, T., Sullivan, K. F. und Wahl, G. M. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* 8 (7), 377-385, 1998.

Karger, C. P., Jakel, O., Heeg, P. und Hartmann, G. H. [Clinical dosimetry for heavy ion therapy]. *Z. Med. Phys.* 12 (3), 159-169, 2002.

Karlsson, K. H. und Stenerlow, B. Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiat. Res.* 161 (5), 517-527, 2004.

Kataoka, Y., Bindokas, V. P., Duggan, R. C., Murley, J. S. und Grdina, D. J. Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 47 (3-4), 245-257, 2006.

Kelly, C., Van, D. R. und Wilkinson, G. W. Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 11), 2887-2893, 1995.

Keogh, M. C., Kim, J. A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J. C. et al. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439 (7075), 497-501, 2006.

Khanna, K. K. und Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27 (3), 247-254, 2001.

Kim, J. A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A. und Haber, J. E. Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *J. Cell Biol.* 178 (2), 209-218, 2007.

Knauf, F. Diplomarbeit "Rolle der post-translationalen Proteinmodifikation bei der Strahlenreaktion. Reparatur einer Läsion innerhalb der Chromatinstruktur." 2007

Kraft G. Radiobiological effects of very heavy ions: inactivation, induction of chromosome aberration and strand breaks. *Nuclear Science Applications* (3):1-28. 1987

Kraft G. RBE and its interpretation. *Strahlentherapie und Onkologie* 175, Sup.2; 44-47. 1999

Kraft G. Tumor therapy with Heavy Charged Particles. *Progress in Particle and Nuclear Physics* 45 (S2) S473-544. 2000 (www.elsevier.nl/locate/npe)

Kraft G., Taucher-Scholz G., und Heilmann J. LET-Effects in DNA. In: Fuciarelli, A.F. und Zimbrick, J.D. (Hrg.) *Radiation Damage in DNA*. Battelle Press

Kraft, G., Kraft-Weyrather, W., Blakely, E. A. und Roots, R. Heavy-ion effects on cellular and subcellular systems: inactivation, chromosome aberrations and strand breaks induced by iron and nickel ions. *Adv. Space Res.* 6 (11), 127-136, 1986.

Kreth, G., Pazhanisamy, S. K., Hausmann, M. und Cremer, C. Cell type-specific quantitative predictions of radiation-induced chromosome aberrations: a computer model approach. *Radiat. Res.* 167 (5), 515-525, 2007.

Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W. G., McNally, J. G. et al. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 172 (6), 823-834, 2006.

Küpper, K., Kolbl, A., Biener, D., Dittrich, S., von, H. J., Thormeyer, T. et al. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116 (3), 285-306, 2007.

Kuroda, M., Tanabe, H., Yoshida, K., Oikawa, K., Saito, A., Kiyuna, T. et al. Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 117 (Pt 24), 5897-5903, 2004.

Lackinger, D. und Kaina, B. Primary mouse fibroblasts deficient for c-Fos, p53 or for both proteins are hypersensitive to UV light and alkylating agent-induced chromosomal breakage and apoptosis. *Mutat. Res.* 457 (1-2), 113-123, 2000.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680-685, 1970.

Lafarga, M., Berciano, M. T., Pena, E., Mayo, I., Castano, J. G., Bohmann, D. et al. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol. Biol. Cell* 13 (8), 2771-2782, 2002.

Lanctot, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G. und Cremer, T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat. Rev. Genet.* 8 (2), 104-115, 2007.

Landers, J. E., Cassel, S. L. und George, D. L. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 57 (16), 3562-3568, 1997.

Lee, S. E., Pelliccioli, A., Demeter, J., Vaze, M. P., Gasch, A. P., Malkova, A. et al. Arrest, adaptation, and recovery following a chromosome double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65, 303-314, 2000.

Liang, F., Romanienko, P. J., Weaver, D. T., Jeggo, P. A. und Jasin, M. Chromosomal dou-

ble-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93 (17), 8929-8933, 1996.

Lehmann, B. D., McCubrey, J. A., Jefferson, H. S., Paine, M. S., Chappell, W. H. und Terrian, D. M. A dominant role for p53-dependent cellular senescence in radiosensitization of human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 6 (5), 595-605, 2007.

Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (3), 323-331, 1997.

Lichten, M. und Haber, J. E. Position effects in ectopic and allelic mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 123 (2), 261-268, 1989.

Lisby, M., Mortensen, U. H. und Rothstein, R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat. Cell Biol.* 5 (6), 572-577, 2003.

Literaturverzeichnis

Liu, Y. und Kulesz-Martin, M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis* 22 (6), 851-860, 2001.

Lobrich, M., Cooper, P. K. und Rydberg, B. Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts. *Radiat. Res.* 150 (6), 619-626, 1998.

Lobrich, M., Rief, N., Kuhne, M., Heckmann, M., Fleckenstein, J., Rube, C. et al. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102 (25), 8984-8989, 2005.

Lombard, D. B. und Guarente, L. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res.* 60 (9), 2331-2334, 2000.

Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M. et al. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 23 (13), 2674-2683, 2004.

MacLachlan, T. K., Takimoto, R. und El-Deiry, W. S. BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol. Cell Biol.* 22 (12), 4280-4292, 2002.

Mallya, S. M. und Sikpi, M. O. Evidence of the involvement of p53 in gamma-radiation-induced DNA repair in human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (2), 231-238, 1998.

Manders, E. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., van, D. R. und Aten, J. A. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 3), 857-862, 1992.

Manuelidis, L. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum. Genet.* 71 (4), 288-293, 1985.

Martin, C., Brochard, V., Migne, C., Zink, D., Debey, P. und Beaujean, N. Architectural reorganization of the nuclei upon transfer into oocytes accompanies genome reprogramming. *Mol. Reprod. Dev.* 73 (9), 1102-1111, 2006.

Martin, R. M., Leonhardt, H. und Cardoso, M. C. DNA labeling in living cells. *Cytometry A* 67 (1), 45-52, 2005.

Martinez-Ramos, I., Maya-Mendoza, A., Gariglio, P. und randa-Anzaldo, A. A global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus. *J. Cell Biochem.* 96 (1), 79-88, 2005.

Maul, G. G., Yu, E., Ishov, A. M. und Epstein, A. L. Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J. Cell Biochem.* 59 (4), 498-513, 1995.

Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O. et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 15 (9), 1067-1077, 2001.

Mayer, R., Brero, A., von, H. J., Schroeder, T., Cremer, T. und Dietzel, S. Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC. Cell Biol.* 6, 44, 2005.

Meaburn, K. J., Cabuy, E., Bonne, G., Levy, N., Morris, G. E., Novelli, G. et al. Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell* 6 (2), 139-153, 2007.

Mirzoeva, O. K. und Petrini, J. H. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell Biol.* 21 (1), 281-288, 2001.

Misteli, T. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291 (5505), 843-847, 2001.

Müller, S., Matunis, M. J. und Dejean, A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 17 (1), 61-70, 1998.

Müller, S., Miller, W. H., Jr. und Dejean, A. Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood* 92 (11), 4308-4316, 1998.

Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W. und Grosse, F. p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85 (7), 1089-1099, 1996.

Munro, T. R. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42 (3), 451-470, 1970.

Murr, R., Loizou, J. I., Yang, Y. G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z. Q. et al. Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8 (1), 91-99, 2006.

Nakamura, T. M., Du, L. L., Redon, C. und Russell, P. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 24 (14), 6215-6230, 2004.

Nasonova, E. A., Shmakova, N. L., Komova, O. V., Mel'nikova, L. A., Fadeeva, T. A., Krasavin, E. A. et al. Cytogenetic effects of low-dose radiation with different LET in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.* 45 (4), 307-312, 2006.

Nazarov, I. B., Smirnova, A. N., Krutilina, R. I., Svetlova, M. P., Solovjeva, L. V., Nikiforov, A. A. et al. Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiat. Res.* 160 (3), 309-317, 2003.

Nelms, B. E., Maser, R. S., MacKay, J. F., Lagally, M. G. und Petrini, J. H. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* 280 (5363), 590-592, 1998.

Newman, H. C., Prise, K. M. und Michael, B. D. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (8), 1085-1093, 2000.

Obrieg, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L. und Hardesty, B. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246 (1), 174-181, 1971.

Olins, A. L., Olins, D. E., Franke, W. W., Lipps, H. J. und Prescott, D. M. Stereo-electron microscopy of nuclear structure and replication in ciliated protozoa (*Hypotricha*). *Eur. J. Cell Biol.* 25 (1), 120-130, 1981.

Oliver, F. J., Menissier-de, M. J. und de, M. G. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (5), 1282-1288, 1999.

Pagano, M., Theodoras, A. M., Tam, S. W. und Draetta, G. F. Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev.* 8 (14), 1627-1639, 1994.

Parada, L. A., Sotiriou, S. und Misteli, T. Spatial genome organization. *Exp. Cell Res.* 296 (1), 64-70, 2004.

Parada, L. und Misteli, T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 12 (9), 425-432, 2002.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. und Bonner, W. M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10 (15), 886-895, 2000.

Pearson, M. und Pelicci, P. G. PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene* 20 (49), 7250-7256, 2001.

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S. et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406 (6792), 207-210, 2000.

Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Difilippantonio, M. J., Wilson, P. C. et al. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414 (6864), 660-665, 2001.

Peterson, C. L. und Cote, J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* 18 (6), 602-616, 2004.

Petrini, J. H. und Stracker, T. H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13 (9), 458-462, 2003.

Pisano, S., Marchioni, E., Galati, A., Mechelli, R., Savino, M. und Cacchione, S. Telomeric nucleosomes are intrinsically mobile. *J. Mol. Biol.* 369 (5), 1153-1162, 2007.

Pouget, J. P. und Mather, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.* 28 (4), 541-561, 2001.

Prise, K. M., Ahnstrom, G., Belli, M., Carlsson, J., Frankenberg, D., Kiefer, J. et al. A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (2), 173-184, 1998.

Prise, K. M., Pinto, M., Newman, H. C. und Michael, B. D. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat. Res.* 156 (5 Pt 2), 572-576, 2001.

Puck, T.T. und Marcus, O.I. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41 (432-437) 1955.

Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. und Chen, J. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J. Cell Biol.* 153 (3), 613-620, 2001.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. und Bonner, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2), 162-169, 2002.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. und Bonner, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2), 162-169, 2002.

Richardson, C. und Jasin, M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405 (6787), 697-700, 2000.

Richardson, C., Elliott, B. und Jasin, M. Chromosomal double-strand breaks introduced in mammalian cells by expression of I-Sce I endonuclease. *Methods Mol. Biol.* 113, 453-463, 1999.

Ritter, S., Kraft-Weyrather, W., Scholz, M. und Kraft, G. Induction of chromosome aberrations in mammalian cells after heavy ion exposure. *Adv. Space Res.* 12 (2-3), 119-125, 1992.

Robert, J. und Larsen, A. K. Drug resistance to topoisomerase II inhibitors. *Biochimie* 80 (3), 247-254, 1998.

Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. und Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146 (5), 905-916, 1999.

Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. und Bonner, W. M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275 (13), 9390-9395, 2000.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273 (10), 5858-5868, 1998.

Rogers-Bald, M., Sargent, R. G. und Bryant, P. E. Production of chromatid breaks by single dsb: evidence supporting the signal model. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (1), 23-29, 2000.

Rothkamm, K. und Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (9), 5057-5062, 2003.

Rubbi, C. P. und Milner, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.* 22 (4), 975-986, 2003.

Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B. M. et al. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J. Cell Biol.* 146 (6), 1211-1226, 1999.

Sadoni, N., Sullivan, K. F., Weinzierl, P., Stelzer, E. H. und Zink, D. Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma* 110 (1), 39-51, 2001.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K. und Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39-85, 2004.

Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M. et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* 59 (17), 4375-4382, 1999.

Savage, J. R. Cancer. Proximity matters. *Science* 290 (5489), 62-63, 2000.

Savage, J. R. Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (4), 234-244, 1993.

Schardin, M., Cremer, T., Hager, H. D. und Lang, M. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet.* 71 (4), 281-287, 1985.

Scholz, M. Effects of ion irradiation on cells and tissues in *Adv Polym Sci* 162: 95-155, Springer, Heidelberg. 2003

Scholz, M. und Kraft, G. Track structure and the calculation of biological effects of heavy charged particles. *Adv. Space Res.* 18 (1-2), 5-14, 1996.

Schon, W., Ziegler, C., Gartner, H. und Kraft, G. Heavy ion induced membrane damage: hemolysis of erythrocytes and changes in erythrocyte membrane fluidity. *Radiat. Environ. Biophys.* 33 (3), 233-241, 1994.

Schulz-Ertner, D., Nikoghosyan, A., Thilmann, C., Haberer, T., Jakel, O., Karger, C. et al. Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58 (2), 631-640, 2004.

Schweinfurth, Y. Diplomarbeit "Untersuchung der subnuklearen Lokalisation von TP53 nach Bestrahlung" 2002

Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G. und Bonner, W. M. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158 (4), 486-492, 2002.

Sengupta, S. und Harris, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (1), 44-55, 2005.

Skalski, V., Lin, Z. Y., Choi, B. Y. und Brown, K. R. Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene* 19 (29), 3321-3329, 2000.

Sokolov, M. V., Dickey, J. S., Bonner, W. M. und Sedelnikova, O. A. gamma-H2AX in By-stander Cells: Not Just a Radiation-Triggered Event, a Cellular Response to Stress Mediated by Inter-cellular Communication. *Cell Cycle* 6 (18), 2210-2212, 2007.

Song, H., Hollstein, M. und Xu, Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat. Cell Biol.* 9 (5), 573-580, 2007.

Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T. et al. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 9 (6), 675-682, 2007.

Spector, D. L. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* 114 (Pt 16), 2891-2893, 2001.

Splinter, J. persönliche Mitteilung zu γ H2AX Färbung nach Laserbestrahlung

Sporbert, A., Gahl, A., Ankerhold, R., Leonhardt, H. und Cardoso, M. C. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol. Cell* 10 (6), 1355-1365, 2002.

Staab, A., Zukowski, D., Walenta, S., Scholz, M. und Mueller-Klieser, W. Response of Chinese hamster v79 multicellular spheroids exposed to high-energy carbon ions. *Radiat. Res.* 161 (2), 219-227, 2004.

Stadler, S., Schnapp, V., Mayer, R., Stein, S., Cremer, C., Bonifer, C. et al. The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. *BMC. Cell Biol.* 5 (1), 44, 2004.

Stenerlow, B., Hoglund, E., Carlsson, J. und Blomquist, E. Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (4), 549-557, 2000.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M. und Jeggo, P. A. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64 (7), 2390-2396, 2004.

Stucki, M. und Jackson, S. P. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 5 (5), 534-543, 2006.

Sun, H. B., Shen, J. und Yokota, H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* 79 (1), 184-190, 2000.

Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S. und Watanabe, M. Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 165 (3), 269-276, 2006.

Szak, S. T. und Pietenpol, J. A. High affinity insertion/deletion lesion binding by p53. Evidence for a role of the p53 central domain. *J. Biol. Chem.* 274 (6), 3904-3909, 1999.

Tang, W., Willers, H. und Powell, S. N. p53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in gamma-irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 59 (11), 2562-2565, 1999.

Taucher-Scholz, G. und Jakob B. Ion irradiation as a tool to reveal the spatiotemporal dynamics of DNA damage response processes in *Genome Dyn Stab* (1): 453-478. 2006

Taucher-Scholz, G. und Kraft, G. Influence of radiation quality on the yield of DNA strand breaks in SV40 DNA irradiated in solution. *Radiat. Res.* 151 (5), 595-604, 1999.

- Taucher-Scholz, G.** persönliche Mitteilung zu Chromatinstrukturanalysen von D. Zink
- Teller, K.,** Solovei, I., Buiting, K., Horsthemke, B. und Cremer, T. Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104 (38), 14970-14975, 2007.
- Thoma, F.,** Koller, T. und Klug, A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83 (2 Pt 1), 403-427, 1979.
- Tibbetts, R. S.,** Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13 (2), 152-157, 1999.
- Tobias, C. A.,** Blakely, E. A., Chang, P. Y., Lommel, L. und Roots, R. Response of sensitive human ataxia and resistant T-1 cell lines to accelerated heavy ions. *Br. J. Cancer Suppl* 6, 175-185, 1984.
- Tomilin, N. V.,** Solovjeva, L. V., Svetlova, M. P., Pleskach, N. M., Zalenskaya, I. A., Yau, P. M. et al. Visualization of focal nuclear sites of DNA repair synthesis induced by bleomycin in human cells. *Radiat. Res.* 156 (4), 347-354, 2001.
- Topsch J.,** Schweinfurth Y., Scholz M., Taucher-Scholz G. Quantification of ion-induced DNA double strand breaks with flow cytometry. GSI Report 2005
- Topsch, J.,** Scholz, M. und Mueller-Klieser, W. Radiobiological characterization of human tumor cell multilayers after conventional and particle irradiation. *Radiat. Res.* 167 (6), 645-654, 2007.
- Topsch J.** persönliche Mitteilung zu flow-zytometrischen Messungen von γ H2AX
- Tsujii, H.,** Mizoe, J., Kamada, T., Baba, M., Tsuji, H., Kato, H. et al. Clinical Results of Carbon Ion Radiotherapy at NIRS. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 48 Suppl A, A1-A13, 2007.
- Valenzuela, M. T.,** Guerrero, R., Nunez, M. I., Ruiz de Almodovar, J. M., Sarker, M., de, M. G. et al. PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene* 21 (7), 1108-1116, 2002.
- van Attikum, H.** und Gasser, S. M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (10), 757-765, 2005.
- van Gent, Hoeijmakers, J. H.** und Kanaar, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2 (3), 196-206, 2001.
- van, Steensel B., van Binnendijk, E. P.,** Hornsby, C. D., van, der Voort, Krozowski, Z. S., de Kloet, E. R. et al. Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 4), 787-792, 1996.
- Varadaraj, A.,** Dovey, C. L., Laredj, L., Ferguson, B., Alexander, C. E., Lubben, N. et al. Evidence for the receipt of DNA damage stimuli by PML nuclear domains. *J. Pathol.* 211 (4), 471-480, 2007.
- Vassilev, L. T.,** Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303 (5659), 844-848, 2004.
- Vermaak, D.,** Ahmad, K. und Henikoff, S. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (3), 266-274, 2003.
- Vogel, F.** und Schroeder, T. M. The internal order of the interphase nucleus. *Humangenetik.* 25 (4), 265-297, 1974.
- Vogelstein, B.,** Lane, D. und Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810), 307-310, 2000.
- Wahl, G. M.** und Carr, A. M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.* 3 (12), E277-E286, 2001.

Walter, J., Schermelleh, L., Cremer, M., Tashiro, S. und Cremer, T. Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J. Cell Biol.* 160 (5), 685-697, 2003.

Ward, I. M. und Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276 (51), 47759-47762, 2001.

Warters, R. L., Adamson, P. J., Pond, C. D. und Leachman, S. A. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J. Invest Dermatol.* 124 (4), 807-817, 2005.

West, C. M. und Sutherland, R. M. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.* 112 (1), 105-115, 1987.

Weyrather, W. K., Ritter, S., Scholz, M. und Kraft, G. RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity. *Int. J. Radiat. Biol.* 75 (11), 1357-1364, 1999.

Woo, R. A., McLure, K. G., Lees-Miller, S. P., Rancourt, D. E. und Lee, P. W. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 394 (6694), 700-704, 1998.

Woodcock, C. L., Frado, L. L. und Rattner, J. B. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* 99 (1 Pt 1), 42-52, 1984.

Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A. und Whitaker, N. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90 (19), 9021-9025, 1993.

Wu, H., Hada, M., Meador, J., Hu, X., Rusek, A. und Cucinotta, F. A. Induction of micronuclei in human fibroblasts across the Bragg curve of energetic heavy ions. *Radiat. Res.* 166 (4), 583-589, 2006.

Wykes, S. M., Piasentin, E., Joiner, M. C., Wilson, G. D. und Marples, B. Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat. Res.* 165 (5), 516-524, 2006.

Xu, Y. und Baltimore, D. Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.* 10 (19), 2401-2410, 1996.

Yang, Q., Zhang, R., Wang, X. W., Spillare, E. A., Linke, S. P., Subramanian, D. et al. The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53. *J. Biol. Chem.* 277 (35), 31980-31987, 2002.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H. et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* 14 (8), 981-993, 2000.

Zhong, S., Salomoni, P. und Pandolfi, P. P. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell Biol.* 2 (5), E85-E90, 2000.

Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. und Pandolfi, P. P. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J. Exp. Med.* 191 (4), 631-640, 2000a.

Zimber, A., Nguyen, Q. D. und Gespach, C. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal.* 16 (10), 1085-1104, 2004.

Zink, D., Bornfleth, H., Visser, A., Cremer, C. und Cremer, T. Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp. Cell Res.* 247 (1), 176-188, 1999.

Zink, D., Cremer, T., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M. F., Ansorge, W. et al. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum. Genet.* 102 (2), 241-251, 1998.

Zink, D., Fischer, A. H. und Nickerson, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 4 (9), 677-687, 2004.

Zink, D., Mayr, C., Janz, C. und Wiesmuller, L. Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene* 21 (31), 4788-4800, 2002.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	Bindeprotein 1, das an Tumorsupressorprotein p53 bindet
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad 3-related
BER	Basenexzisionsreparatur
BIBA	Biologischen Bestrahlungsanlage
BP	Bragg-Peak
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CCD	charge coupled device (Ladungsträgergekoppelte Schaltung)
CDK	cyclin dependant kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
DAPI	4,6-Diamdino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EC	Eingangskanal
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbance assay
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GFP-H2B	das mit grün fluoreszierenden Protein markierte Histon H2B
Gy	Gray (J / kg)
HCT116	humane Kolonkarzinom-Zelllinie 116
hMre11	humanes Homolog des Hefeproteins Meiotische Rekombination 11
HR	Homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
Ko	Kontrolle
LET	linearer Energietransfer
M	Intensitätsmittelwert
MEF	embryonale Maus-Fibroblasten
M _f	Intensitätsmittelwert nach Extraktion von definierten Signalen (final mean volume)
MF	potentiell mitotisch aktive Fibroblasten (Progenitorfibroblasten)

MRE 11	Meiotic recombination 11 homologue; Proteinkomplex in der DNA-Reparatur, bestehend aus hMre11, Rad 50, NBS1
NBS1	Gen mutiert in Individuen mit Nijmegen breakage syndrom 1
NER	Nukleotid Exzisions Reparatur
NHEJ	Non-homologous-end-joining (Nicht-homologe-Verknüpfung)
p21	auch bekannt als Cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)
p53 ^{Ser15}	an Serin 15 phosphoryliertes Tumorsupressorprotein p53
PBS	'phosphate-buffered saline'
PI	Propidiumiodid
PI-3	Phosphatidylinositol-3OH-Kinasen
PMF	postmitotische Fibroblasten
PML NB	Promyelocytic leukaemia protein (nuclear bodies)
PMT	Photomultiplier
p53	Tumorsupressorprotein p53
RBW	relative biologische Wirksamkeit
r _p	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
UNILAC	Universal Ion Linear Accelerator
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WB	Western Blot
γH2AX	anm Serin 139 phosphoryliertes Histon H2AX
σ	Standardabweichung
σ _f	Standardabweichung von M _f AT Ataxia telangiectasia

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. DER LINEARE ENERGIETRANSFER (LET) VERSCHIEDENER STRAHLENARTEN.	10
ABBILDUNG 2. TIEFENDOSISKURVEN FÜR PHOTONEN UND KOHLENSTOFFIONEN.	10
ABBILDUNG 3. ABDECKUNG EINES ZIELVOLUMENS DURCH ÜBERLAGERUNG MEHRERER EINZELNER BRAGG-PEAKS VERSCHIEDENER ENERGIE. QUELLE: M. SCHOLZ, GSI, DARMSTADT	11
ABBILDUNG 4. DOSISVERTEILUNG, ZELLÜBERLEBEN UND RELATIVE BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT (RBW).....	12
ABBILDUNG 5. DARSTELLUNG DER WIRKUNG (DOSISDEPOSITION) VON DISPERS VERTEILTEN, LOCKER IONISIERENDEN RÖNTGENSTRAHLEN UND IONENSPUREN IM BEREICH DES BRAGG-PEAKS MIT DEM DNA-MOLEKÜL (IM GLEICHEN MAßSTAB). QUELLE: M. KRÄMER, M. SCHOLZ GSI, DARMSTADT	14
ABBILDUNG 6. GENOMORGANISATION.	17
ABBILDUNG 7. DARSTELLUNG DES ZELLKERNS MIT ORGANELLEN UND INTERNEN STUKTUREN.....	18
ABBILDUNG 8. SIGNALE DES DSB-MARKERS γ H2AX IN KONFLUENTEN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG.	25
ABBILDUNG 9. BILDUNG VON γ H2AX-SIGNALEN IN KONFLUENTEN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN UNTERSCHIEDLICHER ENERGIEN.....	27
ABBILDUNG 10. QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI 30 MIN NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG.....	30
ABBILDUNG 11. VERGLEICH DER AUSWERTUNG DER γ H2AX-FOCI 30 MIN NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG MIT ZWEI ARTEN DER BERECHNUNG VON INTENSITÄTS-SCHWELLEN FÜR EIN EXPERIMENT IN MITTELWERTPROJEKTIONEN AB DER MINIMALEN FOCI-GRÖßE VON 5 PIXEL.	31
ABBILDUNG 12. VERGLEICH DER MITTLEREN ANZAHL DER γ H2AX-FOCI 30 MIN NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GEWÄHLTEN SCHWELLE FÜR MINIMALE FOCI-GRÖßE VON 5 BIS 25 PIXEL.....	32
ABBILDUNG 13. EINFLUSS DER PROJEKTIONSART DER BILDSTAPEL AUF DIE QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI 0,5 H NACH BESTRAHLUNG MIT RÖNTGENSTRAHLEN.	33
ABBILDUNG 14. ZEITLICHER VERLAUF DER γ H2AX-FOCI NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG.	34
ABBILDUNG 15. VERGLEICH DER METHODEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-SIGNALE NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.....	36
ABBILDUNG 16. EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE DETEKTION DER γ H2AX-FOCI 5 MIN NACH BESTRAHLUNG MIT CHROM-IONEN.	39
ABBILDUNG 17. γ H2AX-SIGNALE IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN UND UNTERSCHIEDLICHEN EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN.	39
ABBILDUNG 18. BILDUNG VON γ H2AX-SIGNALEN IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT KOHLENSTOFFIONEN IM AUSGEDEHTEN BRAGG-PEAK- BEREICH FÜR DIE ZEITPUNKTE 0,5 UND 72 H UND IN UNBESTRAHLTER KONTROLLE (1 H).	41
ABBILDUNG 19. QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI NACH TUMORTHERAPIE-BEZOGENER BESTRAHLUNG.....	43
ABBILDUNG 20. BILDUNG VON γ H2AX-FOCI IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT KOHLENSTOFFIONEN IM DEFINIERTEN EINGANGSKANAL	

FÜR DIE ZEITPUNKTE 0,5 UND 72 H UND IN UNBESTRAHLTEN KONTROLLKERNEN.....	44
ABBILDUNG 21. VERGLEICH DER MITTLEREN ANZAHLEN DER γ H2AX-FOCI PRO ZELLKERN NACH BESTRAHLUNG IM AUSGEDEHNTEN BRAGG-PEAK UND EINGANGSKANAL MIT VERSCHIEDENEN DOSEN.....	45
ABBILDUNG 22. BILDUNG DER γ H2AX-FOCI NACH BESTRAHLUNG MIT NIEDERENERGETISCHEN KOHLENSTOFFIONEN	46
ABBILDUNG 23. QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI NACH BESTRAHLUNG MIT NIEDERENERGETISCHEN KOHLENSTOFFIONEN IN HUMANEN FIBROBLASTEN.....	47
ABBILDUNG 24. VERTEILUNGEN DER γ H2AX-FOCI PRO ZELLKERN NACH BESTRAHLUNG MIT NIEDERENERGETISCHEN KOHLENSTOFFIONEN.....	48
ABBILDUNG 25. DAS ZELLÜBERLEBEN DER HUMANEN FIBROBLASTEN IM EXPERIMENTMODELL ZU TUMORTHERAPIE-BEZOGENER BESTRAHLUNG.	49
ABBILDUNG 26. BILDUNG VON γ H2AX-FOCI IN PROSTATATA-TUMORZELLEN.....	51
ABBILDUNG 27. QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI UND MIKRONUCLEI IN R-AT1 ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT HOCHENERGETISCHEN KOHLENSTOFF-IONEN IM TUMORTHERAPIE-BEZOGENEN EXPERIMENT.	53
ABBILDUNG 28. BILDUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT SEHR DICHT IONISIERENDEN URAN- UND BLEIIONEN	56
ABBILDUNG 29. VERTEILUNGEN DER γ H2AX-FOCI PRO ZELLKERN UND INTENSITÄTSDIAGRAMME DER γ H2AX-SIGNALE IN EINZELNEN ZELLKERNEN NACH URANBESTRAHLUNG.....	57
ABBILDUNG 30. MITTELWERTE DER FOCI-GRÖßEN UND INTENSITÄTEN NACH BESTRAHLUNG MIT URAN- UND BLEI-IONEN FÜR DIE MESSPUNKTE AUS ABBILDUNG 28	59
ABBILDUNG 31. BILDUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI IN U2OS ZELLEN	61
ABBILDUNG 32 BILDUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER γ H2AX-FOCI IN HeLa-ZELLEN.....	62
ABBILDUNG 33. DARSTELLUNG DER γ H2AX-SIGNALE IM NUKLEUS EINER HeLa ZELLE MIT GFP-MARKIERTEM HISTON H2B 1 H NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.....	64
ABBILDUNG 34. DARSTELLUNG DER γ H2AX-SIGNALE IM NUKLEUS EINER HeLa ZELLE MIT GFP-MARKIERTEM HISTON H2B 41 H NACH BESTRAHLUNG MIT XENON- IONEN WIE IN ABBILDUNG 33 BESCHRIEBEN.....	65
ABBILDUNG 35. BILDUNG DER γ H2AX-SIGNALE NACH BESTRAHLUNG MIT EINEM FESTEN GEOMETRISCHEN MUSTER (5 IONEN ANGEORDNET IM KREUZMUSTER) MIT NICKEL-IONEN (E 4,8 MeV/u, LET 3800 keV/ μ m) AN DER MICROBEAM- ANLAGE FÜR DIE ZEITPUNKTE 0,5, 3 UND 24 H NACH BESTRAHLUNG (γ H2AX: GRÜN, DNA: BLAU).	66
ABBILDUNG 36. VERTEILUNG DER γ H2AX-FOCI PRO ZELLKERN 0,5 UND 24 H NACH DEPOSITION VON 5 IONEN.	67
ABBILDUNG 37. DIE LAGE DER γ H2AX-FOCI BEZOGEN AUF DIE POSITIONEN DER IONEN- DURCHGÄNGE NACH BESTRAHLUNG HUMANER FIBROBLASTEN MIT NICKEL- IONEN (E 4,8 MeV/u, LET 3800 keV/ μ m).	68
ABBILDUNG 38. KOLOKALISATION VON γ H2AX UND 53BP1 IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH INDUKTION VON KOMPLEXEN DNA-LÄSIONEN.	70
ABBILDUNG 39. FOCI DES 53BP1-GFP PROTEINS IN LEBENDEN U2OS-ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.....	72
ABBILDUNG 40. LEBENDZELL-BEOBACHTUNG DER U2OS-53BP1-GFP ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT URANIONEN.	74

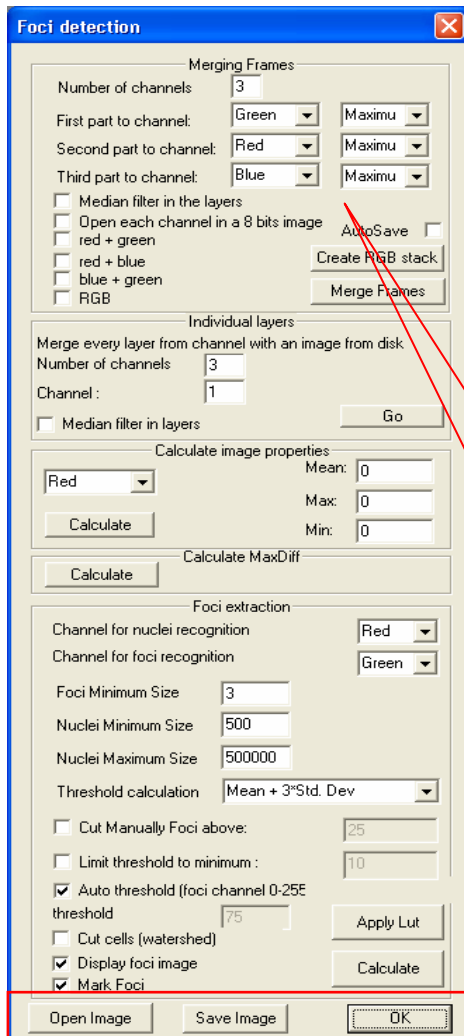
ABBILDUNG 41. LEBENDZELL-BEOBACHTUNG DER U2OS 53BP1-GFP ZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT KOHLENSTOFF-IONEN.....	75
ABBILDUNG 42. AUSWERTUNG DER 53BP1-GFP FOCI NACH IONENBESTRAHLUNG IN LEBENDEN U2OS-ZELLEN.	77
ABBILDUNG 43 ANALYSE DER LOKALISATION DER γ H2AX-FOCI INNERHALB DER CHROMATINSTRUKTUR 1 H NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.	79
ABBILDUNG 44. AUSDEHNUNG DER γ H2AX-SIGNALE IN HeLA ZELLEN MIT GFP-MARKIERTEM HISTON H2B H2B-GFP KERNEN 1 H NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.	80
ABBILDUNG 45. γ H2AX-SIGNALE IN AUSGEWÄHLTEN SCHICHTEN AUS DER AUFNAHME EINER HeLA ZELLE MIT GFP-MARKIERTEM HISTON H2B 41 H NACH BESTRAHLUNG MIT XENON-IONEN.	81
ABBILDUNG 46. AUSDEHNUNG DER γ H2AX-SIGNALE IN HeLA ZELLEN MIT GFP-MARKIERTEM HISTON H2B H2B-GFP KERNEN 41 H NACH BESTRAHLUNG MIT IONEN.	82
ABBILDUNG 47. BILDUNG VON P53-FOCI IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT KOHLENSTOFF- UND URAN-IONEN.	84
ABBILDUNG 48. EINFLUSS DER PROTEIN-MENGE AUF BILDUNG VON STRAHLENINDUZIERTEN P53-FOCI.	86
ABBILDUNG 49. BILDUNG VON P53- UND γ H2AX-FOCI IN HUMANEN FIBROBLASTEN NACH INDUKTION VON DNA-SCHÄDEN MIT ETOPOSID.	88
ABBILDUNG 50. AKKUMULATION VON P53 AN EINZELNEN DNA-DSBs, DIE ENZYMATISCH IN MUNTJAKHIRSCH-ZELLEN INDUZIERT WURDEN.	89
ABBILDUNG 51. DIE DETEKTION VON P53 UND AM SER15 PHOSPHORYLIERTEN P53 IN STRAHLEN-INDUZIERTEN FOCI IN HUMANEN FIBROBLASTEN.....	90
ABBILDUNG 52. BILDUNG DER STRAHLENINDUZIERTEN P53-FOCI IN AT-ZELLEN.	91
ABBILDUNG 53. BILDUNG DER STRAHLEN-INDUZIERTEN P53-FOCI IN NORMALEN SOWIE PARP- 1 DEFIZIENTEN MAUSFIBROBLASTEN (MEF).	92
ABBILDUNG 54. BILDUNG DER STRAHLEN-INDUZIERTEN P53-FOCI VON P53 WT SOWIE DELETIONSMUTANTEN.	93
ABBILDUNG 55. BEHANDLUNG DER HUMANEN FIBROBLASTEN MIT DNASE I NACH BESTRAHLUNG.....	95
ABBILDUNG 56. WESTERN-BLOT-ANALYSE VON P53, γ H2AX, hMre11 UND 53BP1 NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLFRAKTIONEN.	96
ABBILDUNG 57. IMMUNPRÄZIPITATION VON P53 MIT γ H2AX UND MRE11 NACH RÖNTGENBESTRAHLUNG.	96
ABBILDUNG 58. KOLOKALISATION VON P53 UND γ H2AX NACH BLEI-BESTRAHLUNG.	97
ABBILDUNG 59. DETEKTION VON PML-NBS UND P53 NACH BESTRAHLUNG.	99
ABBILDUNG 60. DETEKTION VON PML-NBS UND γ H2AX-FOCI NACH BESTRAHLUNG MIT DER MIKROSTRAHLANLAGE MIT 5 IONEN IM KREUZMUSTER.	101
ABBILDUNG 61. VERGLEICH DER γ H2AX-FOCI-FLÄCHEN NACH RÖNTGEN-, KOHLENSTOFF- UND URANBESTRAHLUNG IN HUMANEN FIBROBLASTEN. ZUSAMMENGEFASST WURDEN WERTE FÜR MITTLERE FOCI-ANZAHL PRO ZELLKERN NACH ABZUG DER JEWEILIGEN KONTROLLWERTE.....	110
ABBILDUNG 62. ZUSAMMENFASSUNG DER VERWENDETEN NIEDERENERGETISCHEN IONEN.	127
ABBILDUNG 63. BESTRAHLUNG MIT HOCHENERGETISCHEN KOHLENSTOFFIONEN IONEN ZUR SIMULATION DER PATIENTENBESTRAHLUNG: A) DER AUFBAU DES EXPERIMENTES, B) DAS TIEFENDOSISPROFIL.	129

ABBILDUNG 64. ZUSAMMENFASSUNG DER IN DER MIKROSTRAHL-ANLAGE VERWENDETEN IONEN.....	130
ABBILDUNG 65. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTIONELLEN DOMÄNEN DES P53 PROTEINS.	145
ABBILDUNG 66 EIN BEISPIEL FÜR DIE ANWENDUNG DER SEMI-AUTOMATISCHEN ERKENNUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON FOCI-SIGNALEN.	174
ABBILDUNG 67. BEISPIEL FÜR ERGEBNISSE EINER FOCI-ZÄHLUNG ZUSAMMENGEFASST IN EINER EXCEL-KOMPATIBLEN TEXTDATEI.	175

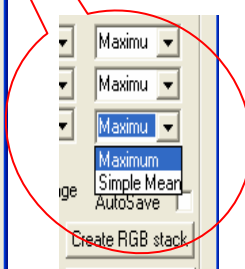
Anhang

Beschreibung der Softwareanwendung für die Quantifizierung der Foci-Signale in konfokalen Aufnahmen

1. Darstellungsmöglichkeiten der Aufnahmen von Bildserien aus verschiedenen Focus-ebenen (Z-Stapeln)



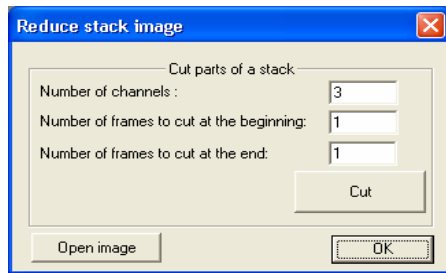
Die Funktionen für die verschiedenen Darstellungsmöglichkeiten der Z-Stapel wurden im ersten Teil des Programms unter der Bezeichnung Merging Frames zusammengefasst. Mit der Funktion Number of channels wurde die Anzahl der aufgenommenen Farbkanäle angegeben sowie die hintereinander folgende Anordnung der Farbkanäle mit den Funktionen first, second und third part to channel. Bei der Betätigung der Funktion Create RGB stack erfolgte die Erzeugung eines Z-Stapels, bei welchem die aufgenommenen Farbkanäle in der einzelnen Schicht überlagert wurden.



Es war möglich zwei Arten von Projektionen der Z-Stapel zu erstellen: die Maximum- oder Mittelwertprojektion (Simple Mean). Dabei wurden die Anzahl und die Anordnung der Farbkanäle wie oben beschrieben definiert. Die Projektionsart war für jeden Kanal individuell wählbar und miteinander kombinierbar.

Zusätzlich konnte für die Erstellung der Mittelwertprojektion ein Medianfilter für jede Schicht angewandt werden (Median filter in the layers). Für das erzeugte Bild konnten die bereits genannten Darstellungen gewählt werden (8 bit image, red + green, red + blue, blue + green, RGB).

Mit der Open Image Funktion wurde die Datei bzw. das Bild geladen. Auf diesem Weg geöffnete Aufnahmen erhielten nach der jeweiligen Bearbeitung einen um die angewandte Bildbearbeitungsprozedur erweiterten Dateinamen und wurden mit diesem Namen im Ursprungsverzeichnis automatisch mit der Funktion Auto Save oder einzeln mit der Save Image Funktion gespeichert.

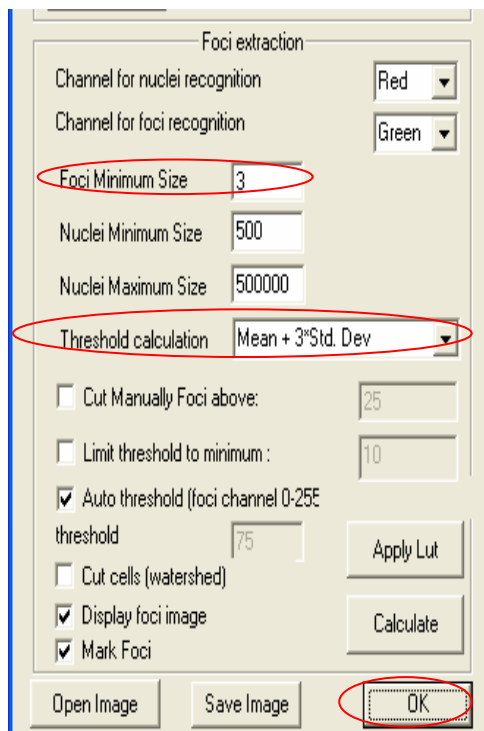


Die Reduce stack image Funktion entfernte aus den Z-Stapeln Aufnahmen von einzelnen Schichten. Nach dem Öffnen des Stack über Open image wurde zuerst die Anzahl der Farbkanäle über Number of channels definiert. Die nächste Eingabe konzentrierte sich auf die Anzahl der Schichten, die vom Anfang bzw. Ende des Z-Stapels entfernt werden sollten. Das Programm führte diese Prozedur für die angegebene Anzahl von Kanälen

aus.

2. Quantitative Analysen der Foci

Für die quantitative Analyse der Foci (Bestimmung der Anzahl, Fläche usw.) in einer 2-D Darstellung wurde die Anwendung Foci extraction verwendet. Die Abbildung zeigt die Bedienoberfläche mit kurzer Erläuterung der Auswahlmöglichkeiten:



Die ersten beiden Felder definierten den Farbkanal zur Nuclei-Erkennung und Foci-Zählung (Auswahl jeweils zwischen rot, grün oder blau).

Ein Wert, ab welcher Foci-Größe Objekte als Foci galten, wurde angegeben. Die nächste Eingabe definierte die kleinste und größte Fläche, die als Kern erkannt wurde.

Der Berechnungsmodus für die Intensitätsschwelle jedes einzelnen Kerns wurde aus der Liste ausgesucht (s. unterer Text). Zusätzlich war eine ausgewählte Intensitätsschwelle mit einem manuell eingegebenen Schwellenwert für die Foci-Zählung kombinierbar (cut manually foci above) und ein minimaler Wert des Schwellenwertes definierbar (limit threshold to minimum).

Eine Korrektur des Kernsignals zur besseren Kernerkennung konnte mit der Funktion Apply Lut durch Aufrufen von gespeicherten Einstellungen oder manuell im Programm Image Pro Plus erfolgen.

Zur Trennung von nah beieinander liegenden Zellen wurde eine schwarze durchgezogene Linie oder die Image Pro Plus Funktion cut cells (watershed filter) verwendet. Die Taste Calculate startete den Vorgang.

3. Die Rechenprozedur für die Zählung der Foci

Das Programm zählte und berechnete Foci aus RGB Bildern. Aus diesem Grund wurde die komfortable Funktion zur Darstellung der Z-Stapeln als Projektionen mitprogrammiert. Nach der Auswahl der Parameter im Teil der Bedienoberfläche „foci extraction“ erfolgte die Zählung. Bei dieser Rechenprozedur fanden zwei Farbkanäle Verwendung ohne den optional vorhandenen dritten Kanal einzubeziehen. Für die Erkennung aller Objekte (Zellkerne und

Foci) wurde das Schwellenwertverfahren angewandt. Dabei erfolgte die Einteilung der Bildinhalte nach dem Prinzip „Hintergrund“ und „Objekt von Interesse“. Die ausgewählten und dann programmierten Rechenschritte wurden in der folgender Zusammenfassung erläutert.

3.1. Erkennung der Zellkerne

Im ersten Schritt wurde im Nukleikanal der Kontrast mit der „Best Fit equalization“ Anwendung erhöht und das Hintergrundrauschen mit Tiefpaßfilter geglättet. Darauf folgte die Berechnung eines Intensitäts-Schwellenwertes, welcher die Objekte vom Hintergrund separierte. Diesen Schwellenwert erzeugte eine Anwendung aus der Unterprogramm-Bibliothek von Image Pro Plus. Der nächste Programmschritt tastet das Bild ab, um eine Maske zu extrahieren. Hierbei wurden Pixel mit Intensitätswerten über dem Schwellenwert weiß und unter dem Schwellenwert schwarz dargestellt. Die erzeugte Maske wurde mit einem Median-Filter behandelt, um gleichmäßige Konturen der Objekte zu erhalten. Die Anwendung dieser Prozedur vermeidete, dass beim späteren Benutzen des Separationfilters dieser die Kerne in Stücke aufteilt. Für den Benutzer bestand die Möglichkeit der Wahl der automatischen Separation von Objekten durch das Anklicken des „watershed filters“ oder der manuellen Trennung der Objekte per Hand. Das jetzt vorhandene Binär-Bild diente zur Erzeugung der Endmaske. Die bisdahin generierte Maske wurde erneut gescannt, um "Objekte vom Interesse" zu extrahieren (weiße Pixel). Nur Objekte mit der definierten Größe (Auswahl: nuclei min. oder max. size) wurden einbezogen. Die Möglichkeit der Wahl der Minimalen- und Maximalen Kerngröße filtrierte zusätzlich z.B. übereinanderliegende Kerne oder Bruchstücke von Kernen und ersparte spätere Korrekturen. Am Ende der Prozedur erfolgte die Bestimmung der Position des Mittelpunktes jedes erkannten Objektes. Die erstellte Liste mit den Positionen dieser Pixel wurde bei späteren Anwendungen genutzt.

3.2. Erkennung der Foci

3.2.1 Berechnung des Intensitäts-Schwellenwertes für jeden erkannten Nucleus

Diese Berechnungen erfolgten im Foci-Kanal unter der Verwendung der vorher erzeugten Nuklei-Maske. Im ersten Schritt wurde jeder einzelne Kern Pixel für Pixel gescannt, um den Mittelwert (M) und die Standardabweichung (σ) der Pixel-Intensitäten im gesamten Nucleus zu bestimmen. Die endgültige Bestimmung des Mittelwertes (M_f ; final mean volume) und der Standardabweichung (σ_f) erfolgte durch ein zweites Scannen des Nucleus. Hierbei wurden alle Pixel, deren Intensität größer als $M+2\sigma$ war, ausgeschlossen. Diese Ausschlussprozedur vermied die Zunahme der Standardabweichung mit steigender Anzahl an Foci. Bei der Aktivierung der Option „cut manually foci above“ wurde der manuell angegebene Wert als der $M + 2\sigma$ Wert verwendet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der maximalen Intensität in jedem Zellkern. Nach der Ermittlung des Mittelwertes und der Standardabweichung für jeden einzelnen Kern war die ausgewählte Schwelle relevant. Die zur Auswahl stehenden Optionen wurden unten aufgelistet. Diese Kombinationen wurden anhand von durchgeführten Auswertungen ausgesucht:

- Mean + Stand. Dev. : Schwellenwert ist $M_f + \sigma_f$
- Mean + 2* Stand. Dev. : Schwellenwert ist $M_f + 2\sigma_f$
- Mean + 3* Stand. Dev. : Schwellenwert ist $M_f + 3\sigma_f$
- Mean + 4* Stand. Dev. : Schwellenwert ist $M_f + 4\sigma_f$
- Mean + 5* Stand. Dev. : Schwellenwert ist $M_f + 5\sigma_f$
- Half value : Schwellenwert ist $(\max. \text{Intesität} + M_f)/2$

- 3* Mean value : Schwellenwert ist 3* M_f (M_f errechnet nach manueller Definition von $M+2 \sigma$)

3.2.2. Extraktion der Pixel mit Intensität über dem Schwellenwert

Zuerst wurde ein schwarzes Bild genannt Foci erstellt. Jetzt folgte noch mal das Absuchen von jedem Nucleus im Foci-Kanal Pixel für Pixel. Bei allen Pixeln mit Intensitätswerten über dem errechneten Schwellenwert wurde die Farbe von Schwarz auf Weiß gewechselt. Am Ende dieser Prozedur fügte das Programm die Umrandungen der erkannten Nuclei in dieses Bild dazu (s. Abbildung 66). Dieses erzeugte Foci-Bild wurde jetzt benutzt, um jeden Focus mit der vom Anwender definierten Größe im Originalbild zu erkennen. Hierbei handelte es sich um eine vergleichbare Prozedur wie bei der Erkennung der Kerne. Allerdings war das Schwarz-Weiß-Bild kein Filter und führte somit keine Modifizierung der Form der Foci durch. Anschließend extrahierte das Programm eine Liste der Objekte (Foci) mit Größe und dem errechneten Schwellenwert aus der Aufnahme des Focikanals. Im nächsten Schritt erfolgte die Sortierung dieser Liste der Foci mit dem Ziel der Zuordnung zum jeweiligen Nucleus. Hierfür wurde jeder Kern noch mal gescannt und der Vergleich mit dem Schwerpunkt des Kernes für die Gewinnung dieser Information benutzt sowie die Ergebnisse in einer Liste festgehalten. Am Ende wurde die Liste der Positionen der Pixel, die zu einem Focus gehören extrahiert. Das erlaubte das Lesen der Pixel Intensitäten in dem Originalbild und die Berechnung des Mittelwertes der Focus Intensität. Anschließend erstellte das Makro nach jeder Analyse einer Aufnahme eine Excel- importierbaren Textdatei mit den gemessenen Daten (Abb. Abbildung 67). Die Erstellung dieser Datei erfolgte im Herkunftsordner der Aufnahme und wurde über die gesamte Messreihe fortgeführt.

Die graphischen Ergebnisse der Zählprozedur wurden in der Abbildung 66 dargestellt. Bei Aktivierung der Funktionen Display foci image and mark foci erschienen die Bilder b) und c) nach jeder Kalkulation auf dem Bildschirm.

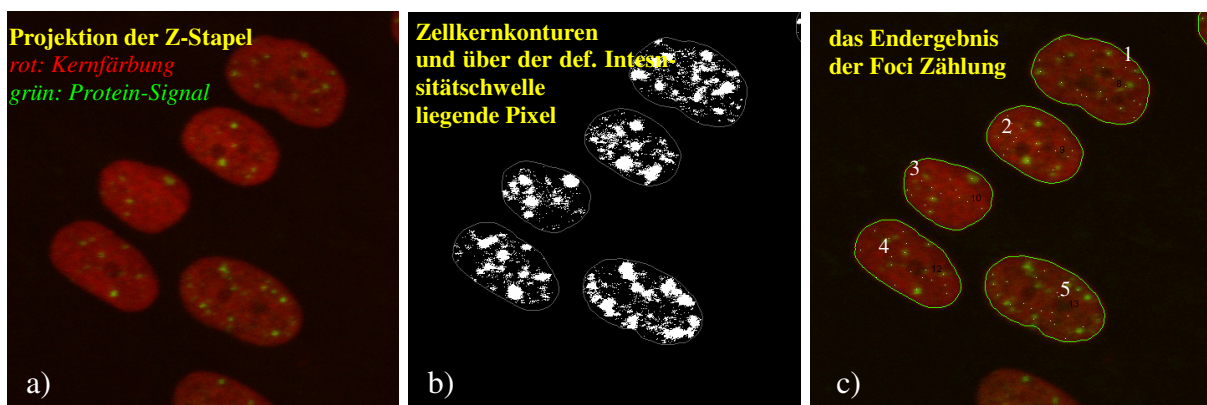


Abbildung 66 Ein Beispiel für die Anwendung der semi-automatischen Erkennung und Quantifizierung von Foci-Signalen.

a) Ein Beispiel für die Projektion eines Z-Stapels mit zwei Farbkanälen. b) Das Ergebnis der Detektion aller Pixel (weiß), die eine Intensität über dem definierten Schwellenwert hatten innerhalb der Zellkernkontur. c) In das Ausgangsbild eingetragene Kontur der Zellkerne und mit weißen Punkten markierte Foci, die neben der definierten Intensität auch das Größenkriterium erfüllen. Die Nummerierung der Nuclei für die Zuordnung der errechneten Werte.

In einer Datei zusammengefasste Ergebnisse für die quantifizierten Signale zeigt die Abbildung 67.

The screenshot shows an Excel window with a file named 'results.txt'. The table contains the following data:

cell	nucleus area	intensity threshold	no foci	Größe	Intensität	x, y Koordinaten	Abstand von (0,0)
1	1873	84	4	9	83	47	61
2	2195	115	2	54	116	49	78
3	5375	174	9	26	133	72	79
4			42	24	104	43	99
5			105	42	188	293	110
6			8	105	175	311	125
7			28	8	212	213	94
8			28	205	221	99	242
9			18	195	200	106	225

Red annotations in the image include:

- Zellkern-Nummer**: points to cell A2.
- Aufnahme**: points to cell B2.
- Anzahl der erkannten Kerne**: points to cell D2.
- Kernfläche**: points to cell B3.
- errechneter Intensitäts-Schwellenwert**: points to cell C3.
- Ergebnis der Focizählung**: points to cell D3.
- Größe**: points to cell G3.
- Intensität**: points to cell H3.
- x, y Koordinaten**: points to cells I3 and J3.
- Abstand von (0,0)**: points to cell K3.

Abbildung 67. Beispiel für Ergebnisse einer Foci-Zählung zusammengefasst in einer Excel-kompatiblen Textdatei.

Das zusammengefasste Endergebnis der Foci-Analyse in Form der Excel Datei wurde für eine Aufnahme innerhalb von wenigen Sekunden erstellt. Nach der Festlegung der geeigneten Parameter für die Analyse der Foci dauerte die Auswertung von einer Messreihe von 10 Aufnahmen mit ca. 150 Zellen etwa 45 Minuten. Für die identische Analyse jedes einzelnen Kerns war bis jetzt ein Zeitraum von ca. 4 h nötig. Mit der Erstellung dieser Programmierung wurde einer schnelleren Methode, die eine objektive und reproduzierbare Auswertung der Signale ermöglichte, etabliert.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. G. Kraft für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung bedanken. Ohne seiner großen Unterstützung und der Motivation von Nachwuchsforschern, besonders junger Müttern wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. T. Holstein von der Universität Heidelberg danke ich für die externe Betreuung der Arbeit, sowie für die Übernahme des Gutachtens. Prof. Dr. P. G. Layer danke ich für die Übernahme des Gutachtens für diese Arbeit.

Dr. G. Taucher-Scholz möchte ich für die Betreuung der Arbeit danken. Als hervorragende Wissenschaftlerin weckte sie meine Begeisterung für dieses Forschungsfeld. Auch Dr. B. Jakob und Dr. J. Topsch danke ich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Danke an alle Mitglieder der DNA-Arbeitsgruppe; ohne deren gegenseitige Hilfe und der Teamarbeit wäre die Durchführung von Experimenten während der Strahlzeiten, die Tag und Nacht stattfanden, nicht möglich gewesen. Danke F. Knauf für ihr Engagement und die Begeisterung während ihrer Diplomarbeit. Meiner Arbeitskollegin und Freundin J. H. Rudolph danke ich für die gemeinsam erlebte Zeit und für den Sonnenschein, den sie in sich trägt. Es ist unersetzlich, jemanden zu haben, der das Leben klarer als man selbst sieht.

Für die Unterstützung bei den Bestrahlungsexperimenten, sowie den damit zusammenhängenden Berechnungen bedanke ich mich bei Dr. M. Scholz, Dr. T. Elsässer, W. Becher und G. Lenz sowie den Dosimetristen. Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Dr. W. Weyrather und an die gesamte Arbeitsgruppe der Biophysik.

Meinen Eltern gilt der große Dank für meine Erziehung und die Unterstützung meines gesamten Werdegangs. Mit ihrer Hilfe war es mir möglich, diesen Weg zu gehen. An dieser Stelle auch dankende Worte an meinen Bruder. Meinen Schwiegereltern, sowie der Uroma auch herzlichen Dank.

Meinem Mann danke ich für seine moralische Unterstützung, für das große Verständnis für die Arbeit in der Forschung und für den nie aufhörenden Glauben an mich. Meinem Sohn danke ich für seine unglaubliche Bereicherung unseres Lebens.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Schweinfurth, Yvonne Eva geb. Borgiel
Geburtsdatum 9.10.1974
Geburtsort Bielitz (Polen)
Familienstand verheiratet, 1 Kind

Akademische und schulische Ausbildung

seit 07 / 2002 Promotion an der Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt zum Thema: „Prozessierung und Reparatur von komplexen DNA-Schäden. Mikroskopische Analyse und Quantifizierung des phosphorylierten Histons H2AX und des Tumorsuppressors p53.“ (Prof. G. Kraft)
02 – 09 / 2004 Mutterschaftspause
2001 – 2002 Diplomarbeit an der Gesellschaft für Schwerionenforschung zum Thema: „Charakterisierung der subnuklearen Lokalisation des Tumorsuppressorproteins TP53.“ (Prof. G. Kraft) in Zusammenarbeit mit der Abteilung der Molekularen Zellbiologie (Prof. T. Holstein)
1999 – 2001 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt (Prof. G. Kraft)
1995- 2002 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit Schwerpunkten: Molekulare Biologie, Genetik und Mikrobiologie
1989 –1995 Abitur an der Alfred Delp Schule in Dieburg
1981 – 1989 Grundschule in Bielitz, Polen

Veröffentlichungen

Jakob B., Splinter J., Schweinfurth Y., Becker G., Chen D., Taucher-Scholz G. Fast recruitment of DNA-PKcs at DNA double-strand breaks. GSI Report 2006
Barberet P., Fournier C., Becker G., Fischer B.F., Heiß M., Schweinfurth Y., Taucher-Scholz G. Transient induction of the cell cycle inhibitor CDKN1 A but no DNA double-strand breaks in bystander cells after targeted exposure to heavy ions. GSI Report 2006
Topsch J., Schweinfurth Y., Scholz M., Taucher-Scholz G. Quantification of ion-induced DNA double strand breaks using flow cytometry. GSI Report 2005
Rudolph J., Jakob B., Schweinfurth Y., Kratz K., Wiese C., Taucher-Scholz G. PCNA dependent accumulation of p21 at heavy ion induced DNA lesions. GSI Report 2004
Schweinfurth Y., Jakob B., Rudolph J., Fink D. and Taucher-Scholz G. Quantification of DNA double strand breaks in cancer therapy related experiments with carbon ions. GSI Report 2004
Schweinfurth Y., Jakob B., Rudolph J. and Taucher-Scholz G. TP53 Foci Formation at Sites of Radiation-Induced DNA-Damage. GSI Report 2003
Jakob B., Borgiel Y., Becker G., Scholz M. and Taucher-Scholz G., Biological Imaging of Heavy Charged Particle Tracks. GSI Report 2002

Tagungsbeiträge und Vorträge

- 2007 Measurements of DNA-double strand breaks after tumour therapy-related carbon irradiation and comparison with γ H2AX analysis after induction of highly complex DNA-lesions.
Poster auf dem 13th International Congress of Radiation Research in in San Francisco
Quantification of residual DNA DSBs after tumour therapy-related ion irradiation.
Poster bei 10th International Wolfsberg Meeting in Ermatingen, Schweiz
- 2006 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in Tumortherapie-bezogener Bestrahlung.
Vortrag auf der 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung
Terapia jonami.
Übersichtsvortrag über die Tumortherapie mit Kohlenstoffionen am Universitätsklinikum in Warschau, Polen
- 2005 Quantification of DNA double strand breaks in cancer therapy related experiments with carbon ions.
Poster auf der Ion Beams In Biology and Medicine Konferenz in Oropa, Italien
- 2004 TP53 foci formation at sites of radiation induced DNA-Damage
Poster auf 8th Meeting of the German DNA Repair Network
- 2003 TP53 foci formation at sites of radiation induced DNA-Damage
Poster auf dem 12th International Congress of radiation research in Brisbane, Australia
TP53 Foci an strahlen-induzierten DNA-Schäden
Vortrag bei 7. Wolfsberg Meeting in Ermatingen, Schweiz
- 2002 TP53 Foci nach ionisierender Bestrahlung: Vergleich der Effekte nach Röntgen-, Kohlenstoff- und Uranstrahlen.
Vortrag bei der 6. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung in Göttingen

Preise und Auszeichnungen

- 2007 Travel Award von der Radiation Research Society (USA) für den 13th International Congress of Radiation Research in San Francisco
- 2003 Young Scientist Travel Award von der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung für den 12th International Congress of Radiation Research in Brisbane
- 2002 Christoph Schmelzer Preis für die Diplomarbeit
„Immunzytochemische Charakterisierung der subnuklearen Verteilung des Tumorsuppressorproteins TP53 nach Bestrahlung“

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne andere als die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Darmstadt, den 6. November 2007