

Aus dem Institut für
Diagnostische und Interventionelle Radiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerald Antoch

Untersuchung potenziell kanzerogener Doppelstrangbrüche
in der DNA humaner Blutlymphozyten
nach klinisch indizierter MRT-Untersuchung des Schädels
mittels γ -H2AX-Assay

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

vorgelegt von
Christiana Dickmann
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Rotem Lanzman

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Feride Kröpil

Zusammenfassung

Die Anzahl der klinischen Untersuchungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) nimmt weltweit stetig zu. Auch wenn die MRT ohne ionisierende Strahlung auskommt, existieren in der Literatur teils widersprüchliche Aussagen hinsichtlich eines potentiell schädlichen Einflusses auf die humane Desoxyribonukleinsäure (DNA).

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob nach klinisch indizierten MRT-Untersuchungen des Schädels potenziell kanzerogene DNA-Doppelstrangbrüche in humanen Blutlymphozyten bei Untersuchungen in 1,5 Tesla oder 3 Tesla (T) MRT auftreten. Ebenfalls soll festgestellt werden, ob der Einfluss von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel (KM) eine Rolle spielt.

Dazu wird 50 Patienten nach Einwilligung jeweils vor und nach der Untersuchung peripheres Blut entnommen. Mit Hilfe des Antikörpers γ -H2AX und einerseits automatisierter Zählung per FACS, sowie andererseits manueller Zählung im Fluoreszenzmikroskop, wird die Anzahl der Doppelstrangbrüche vor und nach der MRT-Untersuchung quantifiziert. Hierbei zeigte sich in der FACS-Analyse und der Fluoreszenzmikroskopie keine signifikante Zunahme an Doppelstrangbrüchen fünf Minuten nach erfolgter MRT-Untersuchung bei 1,5T und 3T.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei MRT-Untersuchungen des Schädels um ein unbedenkliches diagnostisches Verfahren im Hinblick auf die Entstehung von Doppelstrangbrüchen handelt. Ein potentiell kanzerogener Effekt ist daher nicht anzunehmen.

Summary

The number of clinical Magnetic Resonance Imaging (MRI) scans has increased continuously in the last decades. Although MRI does not require ionizing radiation, studies on that topic present contradictory statements concerning the potential hazardous effects on human Deoxyribonucleic Acid (DNA).

This work investigates whether clinical cerebral MRI scans lead to an increase in potentially carcinogenic DNA double strand breaks (DSB) in human blood lymphocytes. Furthermore, this work aims to assess potential differences in DNA DSB between examinations at 1.5T or 3T as well as examinations with and without gadolinium-based contrast material.

For this purpose, peripheral blood was drawn from a total of 50 patients before and after MRI scans. The number of DNA DSB was determined with γ -H2AX antibodies using automated cell counting by flow cytometry and manual cell counting using immunofluorescence microscopy.

Neither FACS-Analysis, nor manual cell counting exhibited significant changes of DNA DSB following MRI.

The results show that cerebral MRI does not lead to an increase of DNA DSB and can therefore be considered as safe regarding potentially cancerogenous effects.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
AU	Arbitrary Units (AU)
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCT domain	<i>Breast Cancer 1 C Terminus domain</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D-Loop	<i>Displacement-Loop</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependend protein kinase</i>
DSB	Doppelstrangbruch / Doppelstrangbrüche
DWI	<i>Diffusion Weighted Imaging</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
18F-FDG-PET/CT	18F-Fluorodeoxyglukose- Positronenemissionstomographie/Computertomographie
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FHA domain	<i>Forkhead-associated domain</i>
FLAIR	<i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HSA	Humanes Serumalbumin
kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1</i>
MFI	<i>Geometric Mean Fluorescence Intensitiy</i>

MNC	<i>Mononuclear Cell</i>
MNNG	N-Methyl-N _x -Nitro-N-Nitrosguanidin
MRA	Magnetresonanzangiographie
Mre11	<i>Meiotic Recombination Protein 1 Nijmegen breakage syndrome 1)</i>
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
MRT	Magnetresonanztomograph / Magnetresonanztomographie
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nbs1	<i>Nijmegen Breakage Syndrome 1</i>
NSF	Nephrogene systemische Fibrose
PBS	<i>Phopshate Buffered Saline</i>
PC	<i>Phase Contrast</i>
PI3-Kinasen	Phosphoinositid-3-Kinasen
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PP4	Protein Phosphatase 4
RPA	<i>Replication protein A</i>
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
SAR	Spezifische Absorptionsrate
SD	<i>Standard Deviation</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STIR	<i>Short-Tau Inversion Recovery</i>
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TE	Echozeit
TI	Inversionszeit
TOF	<i>Time of Flight</i>
TR	Repetitionszeit
UV	ultraviolett
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Magnetresonanztomographie	1
1.1.1 Prinzip	1
1.1.2 Ortskodierung	3
1.1.3 Sequenzen	3
1.1.5 Biologische Effekte der MRT auf den menschlichen Körper	8
1.2 Histon H2AX	10
1.2.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von H2AX	10
1.2.2 γ -H2AX-Antikörper als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche	13
1.3 DNA-Doppelstrangbrüche	14
1.3.1 Entstehung der Doppelstrangbrüche	14
1.3.2 Reparaturmechanismen in eukaryotischen Zellen	14
2. Ziele der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	18
3.1.2 Chemikalien und Antikörper	20
3.2 Patientenkollektiv	21
3.3 Methoden	22
3.3.1 Positivkontrollen	22
3.3.2 Anreicherung von mononukleären Zellen (MNCs)	22
3.3.3 Zellzahlbestimmung	23
3.3.4 Färbung mit CD45-Antikörper	23
3.3.5 Fixierung & Permeabilisierung	24
3.3.6 Färbung mit γ -H2A.X-Antikörper	24
3.3.7 Messung mittels Durchflusszytometrie	24
3.3.8 Auszählung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	26
3.3.9 Statistische Auswertung	29
3.4 MRT-Protokoll	30

4. Ergebnisse	32
5. Diskussion	37
6. Schlussfolgerung	42
7. Literaturverzeichnis	43
8. Anhang	49
9. Danksagung	51

1. EINLEITUNG

1.1 Magnetresonanztomographie

Das Prinzip der Kernspinresonanz entdeckten 1946 unabhängig voneinander die beiden Physiker Edward Mills Purcell und Felix Bloch [1]. Erst 1973 wurde dank der Weiterentwicklung der Technik durch Peter Mansfield und Paul C. Lauterbur die Erzeugung von Schnittbildern möglich, welche dann 1984 durch die Weiterentwicklung von Jürgen Hennig auch im klinischen Alltag zugänglich wurde [1; 2].

Bei der MRT-Untersuchung werden Schnittbilder der zu untersuchenden Körperregion angefertigt, die aufgrund ihres guten Gewebekontrastes vor allem eine gute Beurteilbarkeit von Gehirn, Herz, abdominellen Organen und Gelenken aufweisen.

1.1.1 Prinzip

Die MRT beruht auf dem Prinzip der Kernspinresonanz. Protonen weisen einen Eigendrehimpuls (Spin) und ein magnetisches Dipolmoment auf und richten sich parallel (in z-Richtung) oder antiparallel zum externen, statischen Magnetfeld B_0 aus. Da die parallele Ausrichtung dem niedrigsten Energielevel entspricht, präzedieren mehr Spins parallel zum Magnetfeld B_0 . Werden die Protonen durch elektromagnetische Wechselfelder angeregt, absorbieren und emittieren sie diese, sodass ein messbares Signal entsteht [2].

Die Protonen im menschlichen Körper präzedieren im MRT entlang des statischen Magnetfeldes B_0 in z-Richtung, was der Longitudinalmagnetisierung entspricht (Abb. 1). Werden die Atomkerne einem 90°-Hochfrequenz-Puls (HF-Puls) ausgesetzt, geht die Longitudinalmagnetisierung in eine Transversalmagnetisierung in x-y-Ebene über (Abb. 2).

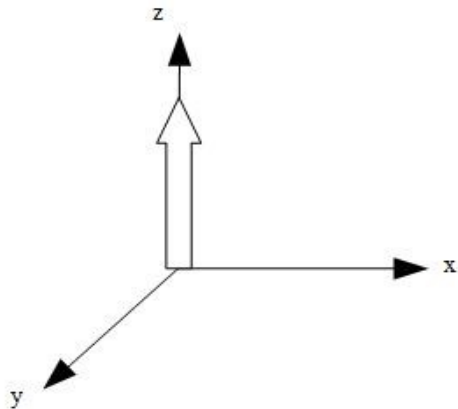


Abb. 1: Longitudinalmagnetisierung
Die Abbildung zeigt schematisch die Longitudinalmagnetisierung, dargestellt durch den Pfeil in z-Richtung, vor dem 90°-Hochfrequenzpuls.

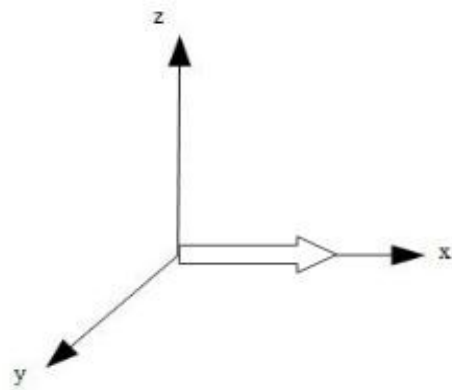


Abb. 2: Transversalmagnetisierung
Die Abbildung zeigt schematisch die Transversalmagnetisierung, dargestellt durch den Pfeil auf der x-Achse, nach dem Einfluss des 90°-Hochfrequenzpulses.

Nachdem der HF-Puls ausgeschaltet wird, beginnen die Wasserstoffkerne sich wieder entlang des Magnetfeldes auszurichten. Dabei unterscheidet man zwei Reputationseffekte: die longitudinale Relaxation (Spin-Gitter-Relaxation) und die transversale Relaxation (Spin-Spin-Relaxation).

Die longitudinale Relaxation wird durch die Zeitkonstante T_1 charakterisiert, welche die Zeit darstellt, in der 63% der Atomkerne wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückgekehrt sind und sich entlang des statistischen Magnetfeldes in z-Richtung ausgerichtet haben. Die Dauer der longitudinalen Relaxation hängt maßgeblich davon ab, wie schnell die Protonen die Energie an das umgebende Gewebe abgeben können. Dies hängt wiederum davon ab, ob die Moleküle im umliegenden Gewebe eine ähnliche Frequenz aufweisen wie die Larmorfrequenz der Protonen.

Die transversale Relaxation wird durch die Zeitkonstante T_2 beschrieben, in welcher sich die transversale Magnetisierung auf 37% des Ursprungswertes zurückbildet. Hierzu kommt es durch interne Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Magnetfeldern der benachbarten Kerne und durch externe Inhomogenitäten des Magnetfeldes (T_2^* -Effekte).

3. MATERIAL UND METHODEN

Beide Relaxationszeiten unterscheiden sich in den verschiedenen Geweben, sodass eine Differenzierung von Strukturen im MRT-Bild möglich ist. So hat zum Beispiel Wasser eine längere T1- und T2-Relaxationszeit als Fett.

1.1.2 Ortskodierung

Würde der gesamte Körper der gleichen Magnetfeldstärke B_0 ausgesetzt werden, wäre eine räumliche Zuordnung der Messsignale nicht möglich. Deshalb ist es notwendig die Feldstärke räumlich zu variieren, indem dem statischen Magnetfeld B_0 verschiedene Gradienten überlagert werden.

Zuerst findet eine Schichtselektion mithilfe eines Gradientenfeldes G_z in z-Richtung statt [2]. Diese erzeugt unterschiedliche Präzessionsfrequenzen entlang der z-Richtung, sodass ein HF-Puls mit einer festgelegten Frequenz nur die Protonen in der Schicht anregt, welche die entsprechende Larmorfrequenz aufweisen. Die Dicke der angeregten Schicht wird dabei durch die Bandbreite des HF-Pulses bestimmt.

Anschließend wird senkrecht zum ersten Schichtenselektionsgradient G_z ein Frequenzgradient G_x geschaltet, der die Protonen einer Schicht wiederum in unterschiedliche Präzessionsfrequenzen bringt. Um die Ortskodierung auf einen Punkt in der Schicht zu begrenzen, wird kurzzeitig ein dritter Phasenkodiergradient G_y angelegt, der die Protonen mit gleicher Frequenz in unterschiedliche Phasen bringt.

Mithilfe der Fourier Transformation werden die verschiedenen Signale dekodiert und in ein Schnittbild mit unterschiedlichen Grauwerten umgewandelt.

1.1.3 Sequenzen

Um Schnittbilder mit verschiedenen Wichtungen zu erhalten, werden unterschiedliche Sequenzen eingesetzt. Diese bestehen jeweils aus einer vorausgewählten Abfolge von unterschiedlichen HF-Pulsen und Gradienten-Pulsen mit ebenfalls variablen Zeitintervallen zwischen den Pulsen. Die Repetitionszeit TR (*time to repeat*) gibt dabei

3. MATERIAL UND METHODEN

die Dauer des Zeitintervalls zwischen zwei Pulsen an, wobei man lange ($TR > 1500\text{ms}$) und kurze ($TR < 500\text{ms}$) Repetitionszeiten unterscheidet [2].

In T1-gewichteten Sequenzen ist die TR kurz. Durch die unterschiedliche Relaxationszeit der verschiedenen Gewebe, entsteht somit ein besserer Gewebekontrast bei einer kurzen Repetitionszeit.

In T2-gewichteten Sequenzen hingegen wird nicht die Repetitionszeit bis zum nächsten Impuls variiert, sondern die Echozeit TE (*time to echo*) [2], bis nach einem Anregungspuls ein Spin-Echo gemessen wird. Dieses Spin-Echo entsteht durch das Senden eines 180° -Pulses nach $TE/2$. Je länger die TE, desto besser der Gewebekontrast. Jedoch sinkt mit zunehmender TE die Signalintensität des Gewebes.

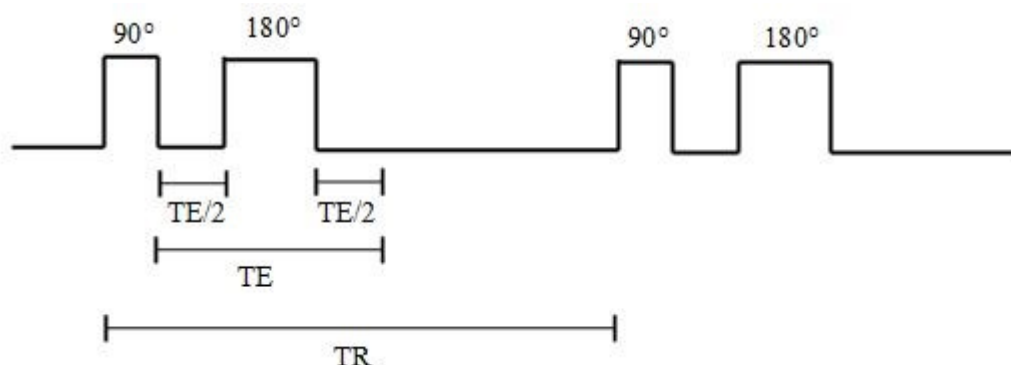


Abb. 3: schematische Darstellung einer Spin-Echo-Sequenz

TE = Echozeit; TR = Repetitionszeit

Bei einer Spin-Echo-Sequenz folgt dem 90° -Anregungspuls nach der Latenzzeit $TE/2$ ein 180° -Puls. Nach der Repetitionszeit TR wird diese Pulsabfolge wiederholt.

Bei allen Sequenzen, die mit einem 90° -Puls beginnen auf den ein 180° -Puls folgt, spricht man von Spin-Echo-Sequenzen (Abb. 3) Abhängig von der Dauer der TR und TE erhält man dann T1-, T2- oder Protonen-gewichtete Bilder.

3. MATERIAL UND METHODEN

Des Weiteren gibt es *Inversion-Recovery*-Sequenzen, welche zuerst einen 180° -Puls senden, gefolgt von einem 90° -Puls (Abb. 4). Hierbei kehrt der 180° -Puls die Longitudinalmagnetisierung in die entgegengesetzte Richtung um. Danach relaxieren die Spins über die Transversalebene zurück zur Ausgangsposition. Sendet man nach einer Inversionszeit TI (*time of inversion*) einen 90° -Puls, wenn die Spins eines Gewebes sich in der Transversalebene befinden, wird kein messbares Signal generiert und das entsprechende Gewebe erscheint im Bild schwarz. So kann bei Kenntnis der TI das Signal eines spezifischen Gewebes unterdrückt werden.

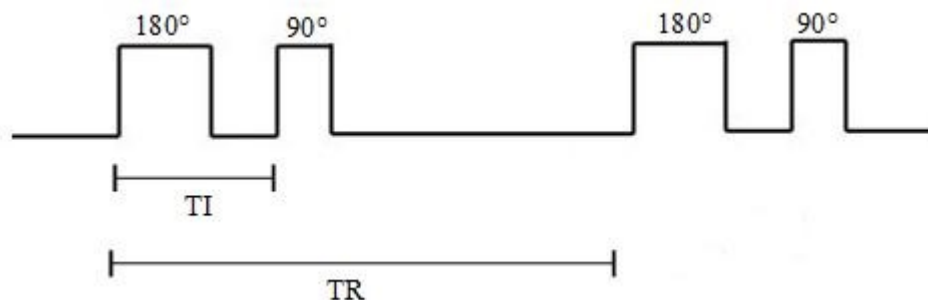


Abb. 4: schematische Darstellung der *Inversion-Recovery*-Sequenz

TI = Inversionszeit; TR = Repetitionszeit

Bei einer *Inversion-Recovery*-Sequenz wird zuerst ein 180° -Puls gesendet, auf welchen nach einer Inversionszeit TI ein 90° -Puls folgt. Nach der Repetitionszeit TR wird diese Pulsabfolge wiederholt.

Diesen Effekt nutzt man bei der Erzeugung von *Fluid-Attenuated-Inversion-Recovery*- (FLAIR) und *Short-Tau-Inversion-Recovery*- (STIR) Sequenzen. Bei der FLAIR-Sequenz verwendet man eine TI von etwa 2000ms um das Signal des Liquors zu unterdrücken und dadurch besser zerebrale Läsionen abgrenzen zu können. In der STIR-Sequenz arbeitet man mit einer TI von etwa 150ms, sodass hier Fettgewebe im Bild schwarz erscheint.

Eine Weitere, häufig in der Schlaganfalldiagnostik verwendete Sequenz, ist die DWI-Sequenz (*Diffusion Weighted Imaging*). Zur Generierung diffusionsgewichteter Bilder werden kurzzeitig zwei Gradientenpulse eingeschaltet (Abb. 5).

3. MATERIAL UND METHODEN

Der erste Gradientenpuls folgt auf den 90° -Anregungspuls, der den Summenvektor der Spins in die xy-Ebene kippt. Durch das Einschalten des Gradientenfeldes mit der Amplitude G und der Dauer δ wird das homogene Magnetfeld des MRT gestört und die Richtung der Magnetisierung ändert sich. Im Zuge dessen tritt auch eine ortsabhängige Änderung der Frequenz der Kerne und somit eine Dephasierung auf, sodass in diesem Moment keine Spannung in der Messspule gemessen wird.

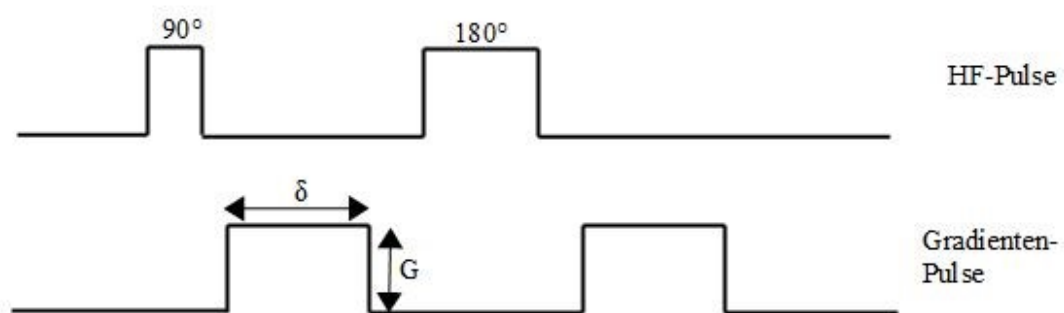


Abb. 5: schematische Darstellung der DWI-Sequenz

G = Amplitude; δ = Dauer des Pulses

Bei einer *Diffusion-Weighted*-Sequenz (DWI-Sequenz) folgt wie bei einer Spin-Echo-Sequenz ein 180° -Puls auf den 90° -Anregungspuls. Zusätzlich werden jedoch Gradientenfelder mit der Amplitude G und der Dauer δ eingeschaltet.

Im Anschluss kehrt ein 180° -Puls die Richtung der Kerne um und es folgt ein weiterer Gradientenpuls mit gleicher Amplitude G und Dauer δ , was dazu führt, dass die Kerne wieder in Phase gelangen und eine messbare Spannung entsteht. Das gemessene Signal ist jedoch schwächer als zu Beginn, da einige Kerne durch Diffusionsbewegung entlang des Gradientenfeldes nicht wieder in Phase treten.

1.1.4 Gadolinium-basiertes Kontrastmittel

Im Rahmen von MRT-Untersuchungen wird bei bestimmten Fragestellungen Gadolinium-basiertes Kontrastmittel (KM) intravenös appliziert, um die Beurteilbarkeit des Gewebes zu verbessern. Aufgrund seiner starken paramagnetischen Eigenschaften ermöglicht es den Protonen im Gewebe schneller zu relaxieren, sodass die Relaxationszeiten verkürzt werden und die Signalintensität in den T1-gewichteten Bildern gesteigert wird.

Aufgrund der starken Toxizität der freien Gadolinium-Ionen (Gd^{3+}), werden diese an Chelate gebunden, da die ungebundenen Ionen aufgrund ihrer ähnlichen Größe als Calciumantagonisten die Myokardkontraktilität und das Gerinnungssystem negativ beeinflussen würden .

Es muss zwischen linearen und makrozyklischen Chelatliganden differenziert werden. Beide Formen können als Bindungspartner verwendet werden, wobei die höhere Stabilität der makrozyklisch aufgebauten KM (z.B. Gadovist®) einen Vorteil gegenüber den linear aufgebauten KM (z.B. Magnevist®) aufweist. So wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass es zu einer Akkumulation und verlängerten Persistenz der linearen KM im Gehirn und anderen Körpergeweben kommt .

Sichtbar wird dies in anschließenden MRT-Bildern, wo eine persistierende, erhöhte T1-Intensität des entsprechenden Gewebes sichtbar ist. Im zerebralen Bereich scheint die Ablagerung vor allem im Bereich des Nucleus dentatus und Globus pallidus stattfinden zu können .

Zum Einfluss des KM auf die nephrotoxische systemische Fibrose (NSF) gibt es ebenfalls ausreichende Studien [69]. Die NSF geht primär mit einer subkutanen und kutanen Entzündungsreaktion einher, die im Verlauf zu Fibrosierungen führen kann. Selten können auch Fibrosierungen weiterer Organe wie Herz, Lunge oder Leber auftreten, die in Einzelfällen zum Tode führen können [73].

Die exakte Genese ist bisher nicht geklärt. Man geht davon aus, dass die NSF durch eine verzögerte Ausscheidung des Gadolinium-basierten Kontrastmittels und eine Ablagerung von dissoziierten Gadolinium-Ionen entsteht. Dabei sind aufgrund der geringeren Chelatbindung nahezu alle in der Literatur beschriebenen NSF Fälle nach

3. MATERIAL UND METHODEN

Gabe eines linearen Kontrastmittels aufgetreten. Nach Gabe von makrozyklischen Kontrastmitteln wird die NSF für bestimmte Substanzen in Einzelfällen beschrieben. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass eine NSF nur bei Patienten mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) <30 ml/h aufgetreten ist, wobei die meisten Fälle bei Patienten mit einer GFR <15 ml/h oder einer terminalen Niereninsuffizienz beschrieben wurde [71].

Die Datenlage zum Einfluss des Gadoliniums auf die DNA hingegen ist relativ spärlich. Jedoch deutet Vieles darauf hin, dass das KM keine Veränderungen der DNA in Form von Doppelstrangbrüchen hervorruft [69; 70].

Die klinische Relevanz der Akkumulation und Ablagerung der linearen Kontrastmittel im Gehirn konnte bisher noch nicht evaluiert werden.

1.1.5 Biologische Effekte der MRT auf den menschlichen Körper

Durch die elektromagnetischen Impulse der MRT werden im menschlichen Körper biologische Effekte ausgelöst [3]. Fiechter et al [53] haben in der durchgeführten *in-vivo*-Studie postuliert, dass es einen Einfluss der kardialen MRT-Bildgebung auf die humane DNA in Form von Doppelstrangbrüchen gibt.

Den größten Einfluss auf Veränderungen des Organismus nimmt hierbei sehr wahrscheinlich die Magnetfeldstärke. In zahlreichen Studien konnten bis zu Magnetfeldstärken von 8T keine Veränderungen im menschlichen Organismus nachgewiesen werden, die eine dauerhafte Schädigung hervorrufen [3]. Jedoch scheinen zumindest während der Untersuchung Auffälligkeiten im Blut, der Körperkerntemperatur und bezüglich des Herz-Kreislauf-Systems aufzutreten [3; 7; 54]. Aufgrund der Polarität vieler Substanzen des menschlichen Organismus, wie zum Beispiel geladener Aminosäuren (Lysin, Arginin, Histidin, Aspartat, Glutamat, Cystein) oder einiger Blutbestandteile, kommt es auch hier zur Ausrichtung entlang des Magnetfelds. Eine *in-vitro*-Studie von Iwasaka et al [4] zeigt beispielsweise, dass sich polymerisierte Fibrinmoleküle entlang des magnetischen Feldes ausrichten und vermehrt zerfallen [4], was zu einer erhöhten Antikoagulation des Blutes führen kann.

3. MATERIAL UND METHODEN

Ebenso verändern inhomogene Magnetfelder die Flussrichtung der paramagnetischen Erythrozyten, da diese an ihrer Oberfläche negativ geladene Polysaccharide tragen, und nehmen somit Einfluss auf den Blutfluss [5-7].

Des Weiteren konnte in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden, dass Radiofrequenzwellen die Körpertemperatur beeinflussen und somit entsprechende weiterführende Veränderungen vor allem von temperatursensiblen Organe wie Hoden oder Augen hervorrufen können [3]. Es zeigte sich, dass sich die Körperkerntemperatur um 0,6°C erhöht, wenn ein 70kg schwerer Patient einer Radiofrequenzenergie von 5 Watt/Kilogramm ausgesetzt wird [8]. Um diese Temperaturveränderungen auszugleichen, reagiert der Körper mit einem Anstieg der Herzfrequenz um 3 Schläge/Minute, wenn Probanden 0,8 W/kg für 17 Minuten ausgesetzt werden [9]. Die oben beschriebenen Abweichungen sind allerdings so minimal oder kurzfristig, dass sie keinen langfristigen Einfluss auf den Organismus haben. Auch nach kardialen MRT-Untersuchungen beschriebene Veränderungen der DNA in Form von Mikronukleus-Erhöhungen sind weitestgehend reversibel und bereits nach 24h wieder im Normbereich [10].

Veränderungen in der DNA sind nach einer Exposition mit ionisierenden Strahlen im Rahmen von Röntgen- oder CT-Untersuchungen in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben worden. So konnte beispielsweise in einer Studie von Löbrich et al. nachgewiesen werden, dass es einen Anstieg von Doppelstrangbrüchen (DSB) im Rahmen von CT Thorax/Abdomen-Untersuchungen gibt, welcher mit der Dosis und Länge der Exposition korreliert [11]. Im Gegensatz hierzu wurden bei diagnostischen CT-Untersuchungen des Schädels weitaus weniger γ -H2AX-Foci detektiert [11].

Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Anzahl der detektierten γ -H2AX-Foci, welche die DSB repräsentieren, bei gesunden Probanden einen Tag nach der Strahleneinwirkung wieder abnimmt, sodass von einer bestehenden DSB-Reparatur ausgegangen werden kann [11]. Somit spielt nicht nur die Dosis und die Länge der Einwirkung von ionisierender Strahlung eine Rolle, sondern auch die persönliche Sensibilität gegenüber Strahlung, hinzukommende Umwelteinflüsse und eine funktionierende DNA-Reparatur [10; 12].

1.2 Histon H2AX

Das humane H2AX-Gen befindet sich auf Chromosom 11 an Position 11q23 [13] und codiert das Histon H2AX, eine Variante des Histons H2A, welches im Zellkern der Eukaryoten vorkommt und ein wichtiger Bestandteil der Chromatin-Struktur ist. Es stabilisiert die DNA, indem es mit den weiteren Histonen H2B, H3 und H4 ein Oktamer bildet und zusammen mit 147 Basenpaaren der DNA ein Nukleosom. Des Weiteren übernimmt das Histon aber auch wichtige Funktionen in der DNA-Reparatur, sodass es als spezifischer und sensitiver Marker für DNA-Schäden verwendet werden kann.

Es unterscheidet sich von den weiteren Varianten des Histons H2A vor allem bezüglich der Länge und Aminosäuresequenz am C-Terminus. Das 142 Aminosäuren lange H2AX-Protein weist in der C-terminalen Region eine um 13 Aminosäuren längere Sequenz auf, welche bei keinem anderen H2A-Histon eines Wirbeltieres zu finden ist. Der C-Terminus des Histons H2AX verfügt über eine Abfolge von Ser-Gln-Glu-Tyr [14], das SQEY-Motiv, welches von bestimmten Enzymen der Phosphoinositid-3-Kinase-Familie erkannt werden kann. In dieser spezifischen Sequenz nimmt das Serin die Position 139 ein.

1.2.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von H2AX

Als Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche wird das Histon am C-Terminus des Serins 139 phosphoryliert [15; 16] und nun als γ -H2AX oder pH2A.X bezeichnet. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass die Phosphorylierung des Histons H2AX den initialen Schritt der DNA-Reparatur darstellt, da γ -H2AX als erstes Produkt noch vor anderen Reparaturfaktoren auftritt und viele nachfolgende Prozesse nur in Anwesenheit von phosphoryliertem H2AX rekrutiert werden [17].

Die Phosphorylierung von H2AX wird initiiert durch den Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (MRN-Komplex), welcher DNA-Doppelstrangbrüche detektiert [18-20]. Er bindet an die freien DNA-Enden des Doppelstrangbruchs, entwindet diese und triggert dann die Bindung und Aktivierung von *Ataxia Teleangiectasia Mutated* (ATM) [18].

3. MATERIAL UND METHODEN

Dieses Enzym gehört zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinase-Familie (PI3K) [13]. Es spielt dabei keine Rolle durch welche Einflüsse der Doppelstrangbruch entstanden ist. Abgesehen von exogenen Noxen und ionisierender Strahlung entstehen Doppelstrangbrüche auch im Rahmen der V(D)J-Kombination und bei der Replikation der DNA [21]. Zu den drei Hauptgruppen der PI3-Kinase-Familie zählen ATM, *Ataxia Teleangiectasia Mutated and Rad3-related* (ATR) und *DNA-dependent Protein Kinasen* (DNA-PKs). Dabei scheint ATM die größte Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung zu spielen [16; 22; 23], während ATR vermehrt durch UV-Strahlung induzierte Schäden repariert [24]. Dabei findet die Phosphorylierung zuerst in einer kleinen Region nahe des DSB statt und dehnt sich dann auf weiter entfernte Moleküle aus [13]. Durch die Aktivierung weiterer Reparaturfaktoren wie *p53 binding protein 1* (53BP1) und *Breast Cancer 1* (BRCA1) [25], wird dann entweder die DNA-Reparatur, der Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet [18; 19].

Neben der Rekrutierung und Aktivierung von ATM durch den MRN-Komplex existiert ebenfalls eine MRN-unabhängige Aktivierung der ATM-Kinase durch Autophosphorylierung. In unbeschädigten Zellen liegt die ATM-Kinase als inaktives Dimer vor, wobei zwei ATM-Moleküle über ihre Kinase-Domäne verbunden sind [26]. Diese Domäne enthält das Serin 1981, welches beim Auftreten eines DNA-Doppelstrangbruchs durch eine Autophosphorylierung des Serins eines der beiden ATM-Moleküle modifiziert wird. In Form eines aktiven Monomeres dissoziiert die autophosphorylierte ATM-Kinase daraufhin vom Komplex und kann andere Substrate phosphorylieren [26; 27].

Nach der frühzeitigen Phosphorylierung von H2AX, welche vor allem proximal des Doppelstrangbruchs stattfindet, bindet das *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1) direkt an das entstandene γ -H2AX [25; 28]. Es fungiert als Mediator zwischen γ -H2AX und ATM, indem es an die *Forkhead-associated domain* (FHA-Domäne) des γ -H2AX und an die *Breast Cancer 1 C-Terminus Domain* (BRCT-Domäne) der ATM-Kinase bindet [29]. Die direkte Bindung von MDC1 bewirkt eine Akkumulation von aktiver ATM-Kinase in der Umgebung des Doppelstrangbruchs und eine Amplifikation der ATM-abhängigen Phosphorylierung von weiteren

3. MATERIAL UND METHODEN

Zielpoteinen der DNA-Schadensantwort [29-31]. Zusätzlich besteht ein positiver *Feedback*-Mechanismus zwischen γ -H2AX, MDC1, ATM und dem MRN-Komplex, da die aktivierte ATM eine Retention von MRN-Molekülen im Bereich des Doppelstrangbruchs bewirkt und dadurch wiederum die Rekrutierung von ATM steigert [28-30]. Durch die MDC1-vermittelte Erhöhung der ATM-Kinase breitet sich die Phosphorylierung von H2AX in weiter distal gelegene Bereiche des Doppelstrangbruchs aus [28; 29; 32].

Im Verlauf des DNA-Reparaturprozesses werden nun weitere Proteine in verschiedenen zeitlichen Abständen rekrutiert. Innerhalb weniger Minuten bilden sich 53BP1 Foci, während die Akkumulation von BRCA1-Molekülen einige Stunden in Anspruch nehmen kann [17]. 53BP1 enthält ebenso wie MDC1 eine C-terminale Domäne, die die BRCT-Domäne der ATM-Kinase binden kann [33]. So können in Folge der Aktivierung von ATM weitere Zielpoteine der ATM-Kinase wie p53, CHK2 und BRCA1 aktiviert werden, welche notwendig sind um den weiteren Prozess der DNA-Reparatur (s. Kapitel 1.3.2) einzuleiten.

Nachdem die Reparatur der Doppelstrangbrüche abgeschlossen ist, wird das γ H2AX dephosphoryliert. Hierfür stehen zwei Mechanismen zur Verfügung, wobei noch nicht endgültig geklärt ist, ob die Dephosphorylierung durch eine Phosphatase direkt an der DNA stattfindet oder die Moleküle vorher bereits durch einen Histonaustausch von der DNA dissoziieren [34]. Es werden zwei Enzyme diskutiert, die eine Rolle in der Dephosphorylierung von γ -H2AX zu spielen scheinen: Protein Phosphatase 2A (PP2A) und Protein Phosphatase 4 (PP4) [34-36]. Eine überlappende Funktion der beiden Phosphatasen scheint naheliegend, wobei vor allem PP2A exogen induzierte DNA-Schäden repariert, während PP4 primär endogene, durch die Replikation hervorgerufene Schäden eliminiert [37].

Die Rekrutierung von PP2A ist abhängig von H2AX, jedoch nicht von ATM, ATR oder DNA-PK. Die katalytische Untereinheit PP2A-C lagert sich zusammen mit γ -H2AX an die beschädigten DNA-Bereiche an und dephosphoryliert das Histon [35]. Zusätzlich erhält die PP2A die ATM-Kinase in unbeschädigten Zellen als inaktives Dimer aufrecht, sodass der ATM-Komplex erst nach Beschädigung der DNA dissoziieren und, durch

3. MATERIAL UND METHODEN

Autophosphorylierung aktiviert, weitere Reparaturprozesse auslösen kann [38]. In PP2A-defizienten Zellen persistieren die γ -H2AX-Foci und die Zellen sind hypersensitiv gegenüber DNA-Schädigung [37]. Eine ähnliche Hypersensitivität der Zellen kann auch durch einen Mangel an PP4 hervorgerufen werden. Dieser Phosphatase-Komplex besteht aus den drei Proteinen PP4C, PP4R2 und PP4R3 β [37] und ist ebenfalls essentiell für die Dephosphorylierung von γ -H2AX [34].

Letztendlich signalisiert ein Abfall der γ -H2AX-Foci eine Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche [39], während die Persistenz von γ -H2AX-Foci einen bestehenden Schaden, der noch nicht behoben wurde oder nicht eliminiert werden konnte, anzeigt, sodass γ -H2AX als sensibler Marker für DNA-Doppelstrangbrüche verwendet werden kann [15; 21; 24; 40].

1.2.2 γ -H2AX-Antikörper als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche

Pro Doppelstrangbruch werden einige tausend γ -H2AX-Moleküle generiert und somit eine Chromatindomäne im Bereich mehrerer Megabasenpaare modifiziert [41]. Die starke Akkumulation von γ -H2AX-Molekülen an der geschädigten DNA führt zur Bildung von sogenannten Foci, welche durch einen immunfluoreszierenden Antikörper sichtbar und messbar gemacht werden können. Dieser bindet an das C-terminale Peptid CKATQAS(PO4)QEY des phosphorylierten H2AX [15].

Der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes H2AX, also γ -H2AX-Antikörper, gilt als sensitivste Methode und wird somit auch im Rahmen dieser Studie verwendet. Schon die geringe Strahleneinwirkung von 1mGy kann durch die Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert werden [42]. Andere Methoden, wie zum Beispiel der Comet Assay, werden als weniger sensitiv bewertet [40]. In einer Studie von Sedelnikova et al [43] konnte nachgewiesen werden, dass jeder γ -H2AX-Fokus einem DSB entspricht. Dadurch ergibt sich der zusätzliche Vorteil, dass vielfältige Möglichkeiten zur Messung von Doppelstrangbrüchen durch Immunfluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder Western Blot zur Verfügung stehen [44].

Neben der bereits gut etablierten Nutzung der γ -H2AX-Immunfluoreszenz in experimentellen Studien ist es denkbar den Nachweis von γ -H2AX in Zukunft auch zur Überwachung und Prognose des individuellen Ansprechens auf therapeutische und diagnostische Maßnahmen zu nutzen [24].

1.3 DNA-Doppelstrangbrüche

1.3.1 Entstehung der Doppelstrangbrüche

DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), induziert unter anderem durch ionisierende Strahlung, gehören zu den relevantesten Läsionen, die, wenn sie persistieren und akkumulieren, maligne Tumorerkrankungen initiieren können [11; 45]. Doch auch ein einzelner DSB im Bereich eines essentiell kodierenden Enzyms, kann bereits in einigen Fällen ausreichen um weiterführende Schäden hervorzurufen [46].

Bei einem DSB handelt es sich um eine Läsion der kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe eines Desoxyribosemoleküls und der Hydroxylgruppe am C5'-Atom eines weiteren Desoxyribosemoleküls beider Nukleotidketten der DNA-Doppelhelix.

Diese Form der DNA-Schädigung wird überwiegend inzidentell verursacht und ist somit potenziell schädlich oder aber gezielt im Rahmen der Meiose zum Erhalt der genetischen Diversität oder des Antikörperklassenwechsels induziert.

1.3.2 Reparaturmechanismen in eukaryotischen Zellen

Da DSB eine der gefährlichsten Schadensformen sind, die die genetische Stabilität beeinflussen und deren Akkumulation das Krebsrisiko erheblich erhöht [12; 21; 47], ist es von enormer Bedeutung, dass der DNA-Schaden effektiv behoben wird.

Hierzu existieren zwei Möglichkeiten (Abb. 6) – die nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining, NHEJ) und die homologe Rekombination [33], welche

3. MATERIAL UND METHODEN

komplementär und überlappend arbeiten [48]. In eukaryotischen Zellen findet vermehrt die nicht-homologe Reparatur während der G1-Phase des Zellzyklus statt, wenn keine homologe Kopie verfügbar ist. Dennoch existieren auch homologe Reparaturmechanismen im Rahmen der Replikation in der G2- und S-Phase der Meiose.

Bei dieser Form der DNA-Reparatur führt der in vorherigen Abschnitten bereits erwähnte MRN-Komplex zur Resektion der 5'-Enden der beiden Enden des Doppelstrangbruchs, sodass die beiden 3'-Enden als Einzelstrang vorliegen. Sobald ein DNA-Ende frei liegt, bindet das Replikationsprotein A (RPA) an die einzelsträngige DNA um diese vor weiterem Abbau zu schützen. Zusätzlich ermöglicht es der RAD51-Rekombinase, aktiviert durch BRCA2, die Anlagerung an das einzelsträngige 3'-Ende, sodass diese im Folgenden RPA ersetzt. Des Weiteren bewirkt die RAD51-Rekombinase die Ausbildung eines *Displacement-Loops (D-Loop)*, da sich der DNA-Einzelstrang zwischen einen homologen DNA-Doppelstrang schiebt, wodurch ein neuer DNA-Strang synthetisiert werden kann. Im Rahmen dieser Stranginvasion entsteht eine sogenannte *Holliday-Struktur*, welche schließlich durch Resolvasen wieder aufgelöst wird. Der beschriebene Vorgang wird unterstützt durch Rad52 und Rad54. Der gesamte Prozess der homologen Rekombination ist sehr präzise und weist nur wenige Fehler auf.

Teilweise stellt der DSB die Zelle jedoch vor das gravierende Problem, dass die homologe Sequenz vollständig verloren gegangen ist, sodass verhindert wird, dass die originale, genetische Information resynthetisiert werden kann. Dann ist eine, von homologen Sequenzen unabhängige, NHEJ-Reparatur notwendig. Hierbei wird, vermittelt über die DNA-bindende DNA-PK-Untereinheit KU 70/80, welche sich an die offenen Enden des Bruches anlagert, der XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex aktiviert. Dieser repariert den Defekt, indem die Enden des DSB verbunden werden ohne eine Kopie anzufertigen. Somit wird die NHEJ als fehleranfälliger gewertet und es kommt häufiger zu Veränderungen der Ursprungssequenz, da im Rahmen dieses Reparaturmechanismus nicht selten ein Teil der Erbinformation durch Verlust von Nukleotiden verloren geht [12; 48; 49].

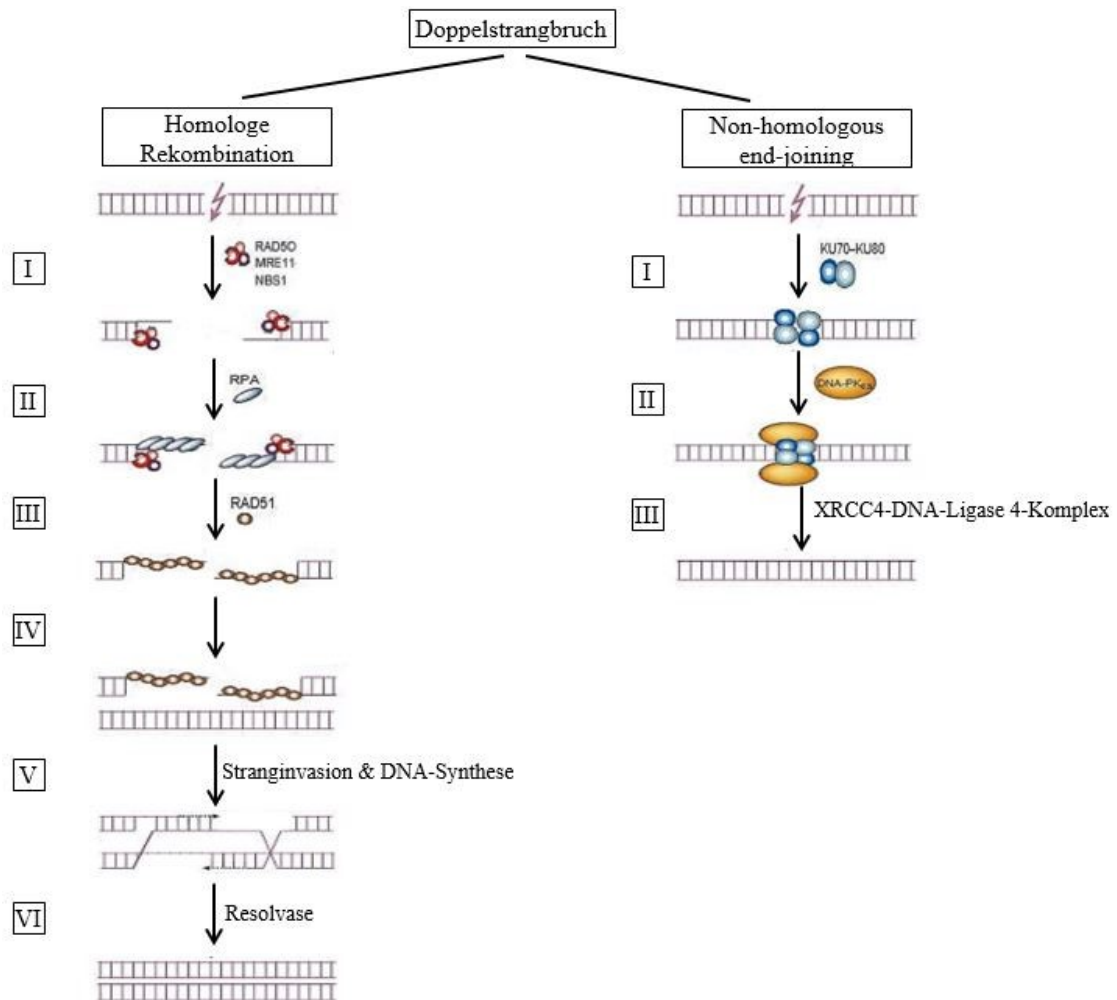


Abb. 6: DNA-Reparaturmechanismen

Im linken Teil der Abbildung wird die homologe Rekombination dargestellt, bei der mit Hilfe des MRE11-RAD50-NBS1-Komplexes (MRN-Komplex), Replikationsprotein A (RPA) und RAD51 die Synthese einer homologen DNA-Sequenz mittels Stranginvasion ermöglicht wird. Im rechten Bereich zeigt sich die Reparatur eines Doppelstrangbruchs mittels *non-homologous end-joining* (NHEJ). Hier wird durch den KU70/80-Komplex, DNA-PKs und den XRCC4-DNA-Ligase 4-Komplex eine Reparatur des Doppelstrangbruchs ohne homologe Sequenz durchgeführt.

Modifiziert nach Hoeijmakers et al, 2001. Mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd: [Nature], 2001 [49]

2. ZIELE DER ARBEIT

Es werden immer häufiger MRT-Untersuchungen durchgeführt. Im Jahr 2009 war Deutschland mit 97 MRT-Untersuchungen pro 1000 Einwohner [50] international führend bezüglich der durchgeführten Untersuchungen. Davon entfielen 26,7% der MRT-Untersuchungen auf den Kopf, sodass diese als zweithäufigste Körperregion nach den Extremitäten (30,7%) untersucht wurde [50].

Das Auftreten von Doppelstrangbrüchen nach Untersuchungen mit ionisierenden Strahlen wurde bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen [24; 51; 52], während bezüglich des Auftretens von Doppelstrangbrüchen bei MRT-Untersuchungen widersprüchliche *in-vitro* Ergebnisse vorliegen.

Bislang konnte die MRT, im Vergleich zu Untersuchungen mit ionisierenden Strahlen, als gesundheitlich unbedenklich angesehen werden. Zumindest in *in-vitro* oder tierexperimentellen Studien konnte allerdings ein Einfluss des Magnetfelds auf humane Blutzellen nachgewiesen werden [3-6; 9]. Hier wurden jedoch hauptsächlich hohe Magnetfeldstärken im Bereich von über 8T verwendet, welche im klinischen Alltag keine relevante Rolle spielen. Zudem wurden diese Studien vornehmlich *in vitro* durchgeführt, sodass ein Einfluss *in vivo* fraglich bleibt.

In einer aktuellen *in-vivo*-Studie wurde nach kardialen MRT-Untersuchungen bei 1,5T mit hohen und schnell wechselnden elektromagnetischen Gradientenpulsen eine erhöhte Anzahl von Doppelstrangbrüchen in humanen Lymphozyten des peripheren Bluts beschrieben [53].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll mit einer größeren Fallzahl das Auftreten von Doppelstrangbrüchen in humanen Lymphozyten nach klinisch indizierten Schädel-MRT-Untersuchungen mithilfe der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob nach klinisch indizierten MRT-Untersuchungen des Schädels potenziell kanzerogene DNA-Doppelstrangbrüche in humanen Blutlymphozyten auftreten. Ebenfalls soll festgestellt werden, ob hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen Untersuchungen in 1,5T oder 3T MRT vorliegt oder ob der Einfluss von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel (KM) eine Rolle spielt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Blutabnahmeröhrchen	BD Vacutainer K2E (EDTA)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	Deckgläser	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland
Durchflusszytometrie-Gerät	BD FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Cellstar® Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Immunfluoreszenz-mikroskop	Axioplan 2 imaging	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Kamera	RT3 Camera	SPOT Imaging Solutions, Sterling Heights, USA
Magnetresonanztomograph	1. Magnetom Avanto 2. Magnetom Trio	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Erlangen, Deutschland

3. MATERIAL UND METHODEN

Objektträger	Shandon Single Cytoslides, beschichtet, 76x26x1mm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Eppendorf Research®- Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Premium Tips	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage	PL200	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Serologische Pipette	Corning Costar Stripette	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zellzähler	CASY® Cell Counter	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Zentrifugen	1. Megafuge 1.0R 2. Heraeus Biofuge Stratos 3. Shandon Cytospin 3	Thermo Scientific, Waltham, USA

3.1.2 Chemikalien und Antikörper

Albumin bovine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bicoll Dichte 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
CASYton-Lösung	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
CD45-Antikörper	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Dapi Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ethylendiamintetraacetate acid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyde (Methanol Free) 10% UltraPure	Polysciences, Eppelheim, Deutschland
Humanes Serum Albumin 5%	CSL Behring GmbH, Hattersheim am Main, Deutschland
Lysepuffer (Aqua ad inject + NH ₄ Cl (8,29g/l) + KHCO ₃ (1,0g/l) + Na ₂ - EDTA (0,0375g/l))	Zentralapotheke Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) Rabbit mAb (Alexa Fluor®488 Conjugate)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.2 Patientenkollektiv

Für die durchgeführten Untersuchungen wurde peripheres Blut von Patienten benötigt, weswegen ein Ethikvotum beantragt wurde. Dieses wurde von der hiesigen Ethikkommission bewilligt (Ifd. Nummer: 4357).

Die vor Beginn der Arbeit durchgeführte Poweranalyse ergab eine notwendige Stichprobengröße von $n = 41$ für ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Über einen Zeitraum von Januar bis September 2014 wurden 50 Patienten in die Studie eingeschlossen, welche sich im Rahmen einer klinisch indizierten MRT-Untersuchung im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf vorstellten.

Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren eine Zuweisung an das Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie für eine MRT-Untersuchung des Schädels und eine schriftliche Einwilligung in die Teilnahme.

Allgemeine Kontraindikationen für eine MRT-Untersuchung (Schrittmacher, implantierte Insulin- oder Schmerzpumpen, Gefäßclips aus Metall, Neurostimulatoren, Cochlea-Implantate, Frühschwangerschaft, etc.) galten als Ausschlusskriterium.

Alle Probanden erhielten eine Schädel-MRT-Untersuchung bei 1,5T oder 3T, wobei die Zuteilung nach klinischer Indikation erfolgte. Ebenso abhängig von der Fragestellung wurde 43 Patienten Gadolinium-haltiges Kontrastmittel (0,3mmol/kg) appliziert. 7 Patienten erhielten kein Kontrastmittel.

Unmittelbar vor und fünf Minuten nach der MRT-Untersuchung wurde den Patienten jeweils 20ml peripher-venöses Blut abgenommen, welches kurzfristig zum Materialtransport in EDTA-Röhrchen aufbewahrt wurde.

Die 26 weiblichen und 24 männlichen Probanden, waren zum Untersuchungszeitpunkt im Durchschnitt $56,7 \pm 15,3$ Jahre alt.

3.3 Methoden

3.3.1 Positivkontrollen

Vor Beginn der Versuche mit peripherem Blut von untersuchten Patienten, wurden einige Vorversuche durchgeführt, in denen gefüllte EDTA-Röhrchen direkt der Strahlung in einer CT-Untersuchung ausgesetzt wurden.

Die bestrahlten Proben wurden nach dem gleichen Protokoll behandelt wie die späteren Patientenproben, um nachzuweisen, dass die Methode zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen verwendet werden kann.

3.3.2 Anreicherung von mononukleären Zellen (MNCs)

Im Anschluss an die venöse Blutabnahme wurden die Proben im hämatologischen Forschungslabor der Universitätsklinik Düsseldorf bearbeitet. Die Isolation der MNCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Hierfür wurde das Blut aus den EDTA-Röhrchen in 50ml Falcontubes überführt und mit PBS auf 35ml aufgefüllt. Danach wurde es vorsichtig auf 15ml Ficoll-Lösung geschichtet und bei 2000rpm für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert.

Anschließend konnte die lymphozytenreiche Interphase abgenommen werden und mit PBS bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, während die verbliebenen MNCs mit 10ml kaltem Erylysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Nach der Erylyse wurden die MNCs zweimal mit *Magnetic Activating Cell Sorting* (MACS)-Puffer (PBS + 0,5M EDTA (3ml/l) + 5% HSA (3ml/l)) gewaschen und erneut bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die MNCs in 1ml MACS-Puffer aufgenommen.

Hiervon wurden 10µl abgenommen und in 10ml CASYton-Lösung gegeben. Die Zählung erfolgte mithilfe des CASY-Zellzählers.

Dieser ermöglicht eine standardisierte Zellzählung, Überprüfung der Vitalität der Zellen, Bestimmung des Zellvolumens und der Verteilung der verschiedenen Zellgrößen. Bei der Messung treten die Zellen mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit durch eine Messkapillare und werden einem elektrischen Spannungsfeld ausgesetzt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen elektrischen Widerstand da. Beim Passieren der Messpore verdrängen die Zellen, abhängig von ihrem Volumen, eine definierte Menge der Elektrolyte. Wenn die Zelle vital ist, ist auch die Zellmembran intakt und die Zelle wirkt isolierend. Der Strom wird nicht weitergeleitet, sodass der Widerstand ansteigt und somit ein Maß für das Volumen der Zelle bildet. Tote Zellen, deren Zellmembran nicht mehr als isolierende Barriere wirkt, werden anhand der Größe ihres Zellkerns gemessen.

Die zusätzliche Pulsflächenanalyse ermöglicht weiterhin eine detaillierte Auswertung der Zellen, sodass auch die Verteilung der verschiedenen Zellgrößen aufgezeichnet wird.

Im Anschluss wurden 5×10^6 Zellen mit MACS-Puffer bei 1200rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

3.3.4 Färbung mit CD45-Antikörper

Als nächstes wurden die MNCs in 100µl MACS-Puffer aufgenommen und es wurden 20µl des CD45-Antikörpers dazugegeben. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 8°C und dann eine Waschung mit 1ml MACS-Puffer.

Der CD45-Antikörper bindet an Epitope auf den Leukozyten und erlaubt später in der Durchflusszytometrie eine Erkennung und Quantifizierung der Leukozyten.

3.3.5 Fixierung & Permeabilisierung

Die Fixierung erfolgte mittels 500µl Formaldehyd (2%) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Im Anschluss wurden die Zellen für 20 Minuten mit 5ml Triton X-100 (0,05%) permeabilisiert.

Danach folgte eine zweimalige Waschung mit Triton X-100 (0,01%).

3.3.6 Färbung mit pH2A.X-Antikörper

Die MNCs wurden für die pH2A.X-Antikörper-Färbung in 100µl Inkubationspuffer aufgenommen und mit diesem 10 Minuten unter Abschirmung von Lichteinstrahlung geblockt.

Anschließend wurden 2,5µl des pH2A.X-Antikörpers dazugegeben und für 30 Minuten bei 8°C inkubiert. Der pH2A.X-Antikörper ist ein grün fluoreszierender Antikörper (Alex Fluor 488), der an das phosphorylierte Serin 139 bindet, welches im Rahmen der Reparatur von Doppelstrangbrüchen gebildet wird.

Abschließend wurde noch einmal mit 1ml PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert, bevor die Zellen in Formaldehyd (0,1%) aufgenommen wurden.

3.3.7 Messung mittels Durchflusszytometrie

Die Zellen, welche nicht für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet wurden, wurden in FACS-Tubes überführt und mithilfe des Durchflusszytometrierätes (FACSCalibur, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) gemessen.

Hierbei wird die Flüssigkeit, welche die Zellen enthält, in hoher Geschwindigkeit gleichzeitig an verschiedenen Lasern vorbeigeführt. Dabei passiert jede Zelle einzeln den Laserstrahl und es können bestimmte Zelleigenschaften wie Größe, Granularität und Färbung gemessen werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die von den Zellpartikeln emittierten optischen Impulse werden von Detektoren in elektrische Impulse umgewandelt. Dabei misst das Vorwärtsstreulicht (*forward-scattered light* = FSC) die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (*side-scattered light* = SSC) die Granularität der Zelle misst. Dies ermöglicht bereits eine Differenzierung der verschiedenen Subpopulationen der Leukozyten (Abb. 7).

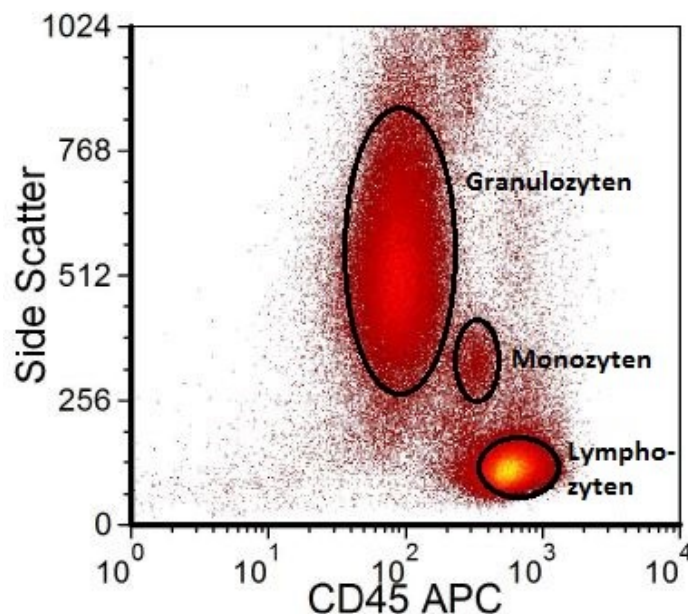


Abb. 7: Dot-Plot der Subpopulationen der Leukozyten in der Durchflusszytometrie

Anhand der Messung des Streulichts und des Fluoreszenzsignals können die Leukozyten in ihre Subpopulation unterteilt werden. Je höher die Granularität einer Zelle, desto größer ist das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*). Zusätzlich können die Lymphozyten durch das Fluoreszenzsignal des CD45-Antikörpers noch besser von den anderen Subpopulationen abgegrenzt werden.

Im Anschluss kann mithilfe des sogenannten *Gaten*, wobei nur eine Subpopulation genauer untersucht wird und alle Weiteren ausgeschlossen werden, eine differenziertere Untersuchung der Zielzellen vorgenommen werden. Hierfür wurden die Zellen zusätzlich durch den spezifischen grün fluoreszierenden Antikörper pH2A.X, welcher an das phosphorylierte Histon H2AX bindet, markiert, sodass die genaue Anzahl der Zellen mit Doppelstrangbrüchen ermittelt werden konnte (Abb. 8).

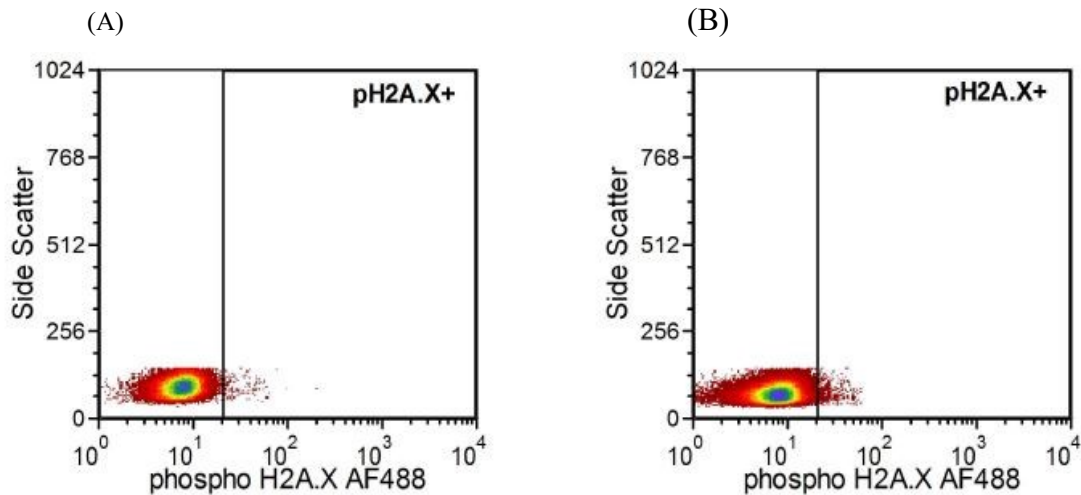


Abb. 8: Dot-Plot der pH2A.X-positiven Zellen vor (A) und nach (B) MRT

Nach dem Gaten der Leukozyten werden nur noch Lymphozyten betrachtet, welche mit dem fluoreszierenden Antikörper pH2A.X angefärbt wurden.

Vor der Messung der Patientenproben wurden Kontrollmessungen zur optimalen Einstellung des Durchflusszytometriegerätes durchgeführt. Im Rahmen der FACS-Messung wurden durchschnittlich 150.000 Ereignisse analysiert. Die direkte Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie erfolgte mit der FCS Express 3-Software. Hierbei wurde einerseits die *Geometric Mean Fluorescence Intensity* (MFI) in *arbitrary units* (AU) zur Quantifizierung der DSB verwendet und andererseits die Anzahl der pH2A.X-positiven Zellen an allen detektierten Zellen in Prozent herausgearbeitet.

3.3.8 Auszählung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen mittels der Shandon Cytospin 3-Zentrifuge (Thermo Scientific) auf einen Objektträger gebracht. Die Zellzahlbestimmung erfolgte erneut mithilfe des CASY-Zellzählers.

Zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI Fluoromount-G, Southern Biotech) verwendet. DAPI ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der bevorzugt an AT-Sequenzen der DNA bindet und es somit ermöglicht Zellkerne anzufärben.

3. MATERIAL UND METHODEN

Nach einer Inkubationszeit von 12h bei 8°C, konnten die Objektträger mit den Zellen mithilfe des Fluoreszenzmikroskops mikroskopiert werden.

Dabei wurden jeweils 10 Aufnahmen in 630facher Vergrößerung mit der RT3-Kamera (SPOT Imaging Solutions) gemacht. Hierbei wurde die Gesamtzahl der Lymphozyten in der DAPI-Färbung gezählt, ebenso wie die Lymphozyten mit einem sichtbaren Doppelstrangbruch (Abb. 9) mithilfe des FITC-Filters, der auch als optimaler Filter für Alexa-Fluor 488 verwendet wird. Anschließend konnte berechnet werden, wie viele Doppelstrangbrüche pro Lymphozyt auftraten. Monozyten und Granulozyten wurden anhand morphologischer Kriterien von der Zählung ausgeschlossen.

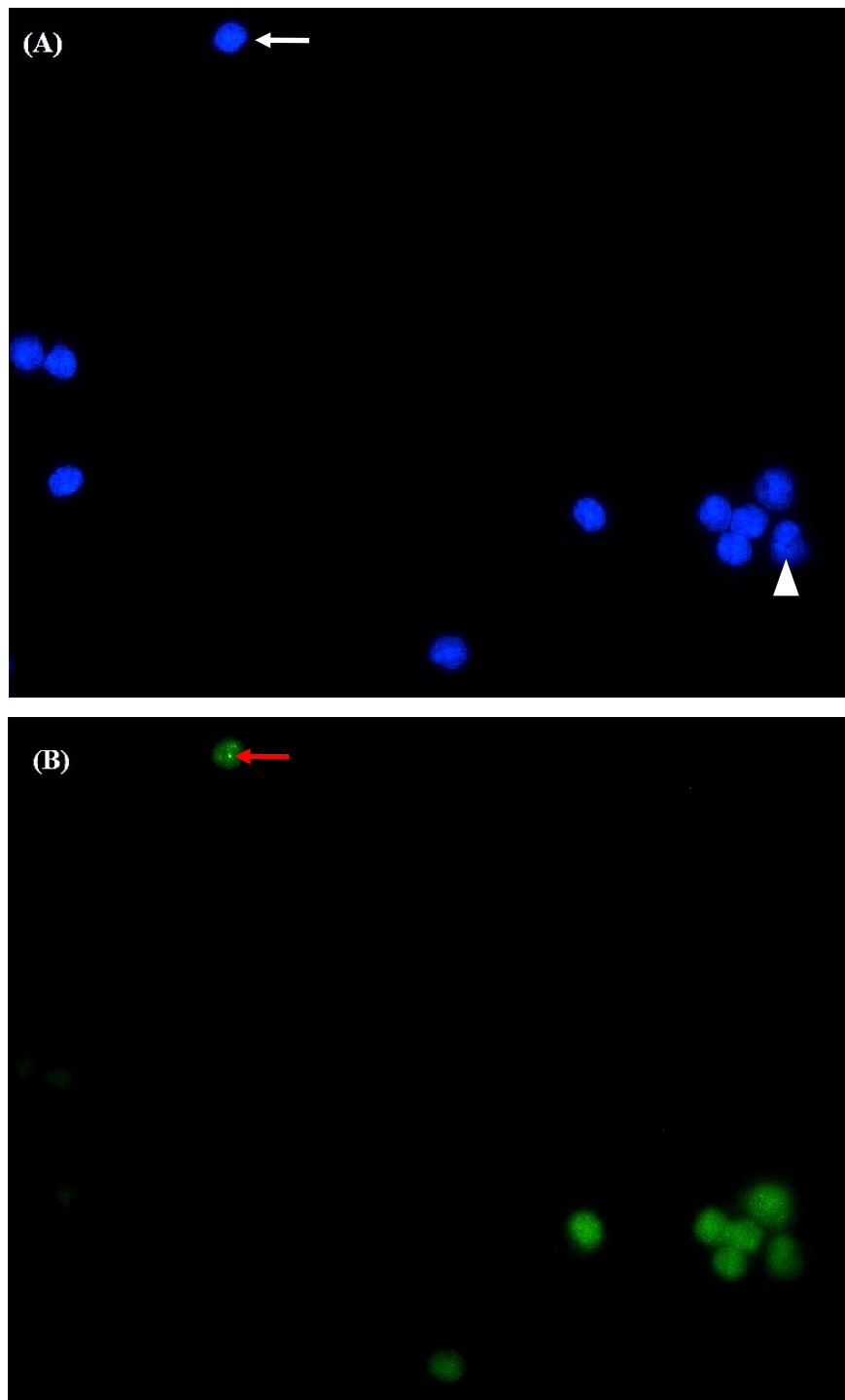


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer Blutprobe nach MRT
630-fache Vergrößerung, (A) Nuclei der Lymphozyten (weißer Pfeil) und Granulozyten (Dreieck) in DAPI-Färbung, (B) Nuclei der Granulozyten und Lymphozyten mit erkennbarem Doppelstrangbruch (roter Pfeil) in Alexa Fluor 488-Färbung.

3.3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten wurde nach Abschluss der Datenerhebung durchgeführt. Im Rahmen des Shapiro-Wilk-Tests zeigte sich eine Normalverteilung der Daten. Es wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (standard deviation = SD) berechnet, sodass anhand des studentischen t-Tests kontrolliert werden konnte, ob sich die Daten vor der MRT- und nach der MRT-Untersuchung signifikant unterscheiden.

3.4 MRT-Protokoll

Die Untersuchungen wurden entweder in einem Siemens Magnetom Avanto 1,5T oder einem Siemens Magnetom Trio 3T durchgeführt. Die Patienten wurden in Rückenlage gelagert und die Kopf-/Hals-Spule angebracht. Nachdem eine Orientierungsmessung zur Schichtplanung durchgeführt wurde, wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Sequenzen eingesetzt. Größtenteils wurde den Patienten Kontrastmittel appliziert (mit KM n=43; ohne KM n=7). Die Untersuchungsdauer betrug im Durchschnitt 17 Minuten $\pm$ 4 Minuten.

Patient	Dauer	KM	Sequenzen
P001	00:21	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1; PC3D-MRA
P002	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P003	00:17	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P004	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P005	00:20	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P006	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P007	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P008	00:20	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1; TOF-MRA
P009	00:17	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P010	00:21	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P011	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P012	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P013	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P014	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P015	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P016	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1
P017	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P018	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P019	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P020	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P021	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P022	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1

3. MATERIAL UND METHODEN

P023	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P024	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P025	00:13	nein	T2; DWI; FLAIR; TOF-MRA
P026	00:14	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T2
P027	00:12	nein	T2; DWI; FLAIR; TOF-MRA
P028	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P029	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P030	00:35	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P031	00:20	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1; TOF-MRA
P032	00:12	nein	T2; T2*; DWI; PWI; FLAIR; TOF-MRA
P033	00:14	nein	T2*; DWI; FLAIR; TOF-MRA
P034	00:31	ja	T2; T2*; DWI; T1; TOF-MRA
P035	00:11	nein	T2*; DWI; FLAIR; TOF-MRA
P036	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P037	00:18	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P038	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P039	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P040	00:21	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P041	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1; TOF-MRA
P042	00:13	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P043	00:16	nein	T2; DWI; STIR, T1; FLAIR; T1
P044	00:09	nein	T2*; DWI; FLAIR; TOF-MRA
P045	00:31	ja	T2; T1; STIR
P046	00:19	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P047	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P048	00:15	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P049	00:16	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1
P050	00:22	ja	T2; T2*; DWI; T1; FLAIR; T1

Tabelle 1: MRT-Sequenzen und Dauer der Untersuchungen

Die Tabelle zeigt für jeden Patienten die Dauer der MRT-Untersuchung in Minuten, ob Kontrastmittel (KM) appliziert wurde und welche Sequenzen (DWI= *Diffusion Weighted Imaging*, FLAIR= *Fluid Attenuated Inversion Recovery*) angewendet wurden.

4. ERGEBNISSE

Die MRT-Untersuchungen aller eingeschlossenen Patienten konnten vollständig durchgeführt werden und die Dauer der MRT-Untersuchungen betrug durchschnittlich 17 ± 4 Minuten. Die Blutproben aller Studienteilnehmer konnten hinsichtlich des Auftretens von Doppelstrangbrüchen ausgewertet werden.

Die Auswertung der Proben mittels FACS-Analyse (n=50) ergab im Mittel einen nicht signifikanten Abfall der Anzahl pH2A.X-positiver Lymphozyten an allen gemessenen Lymphozyten von 0,15% (SD=0,20%) vor MRT auf 0,14% (SD=0,19%) nach MRT (p=0,39) (Abb. 10, Abb. 11). Auch die MFI zeigte keinen signifikanten Anstieg (MFI vor MRT: $7,73 \pm 5,62$ AU; MFI nach MRT: $7,05 \pm 3,96$ AU) der DSB (p=0,13).

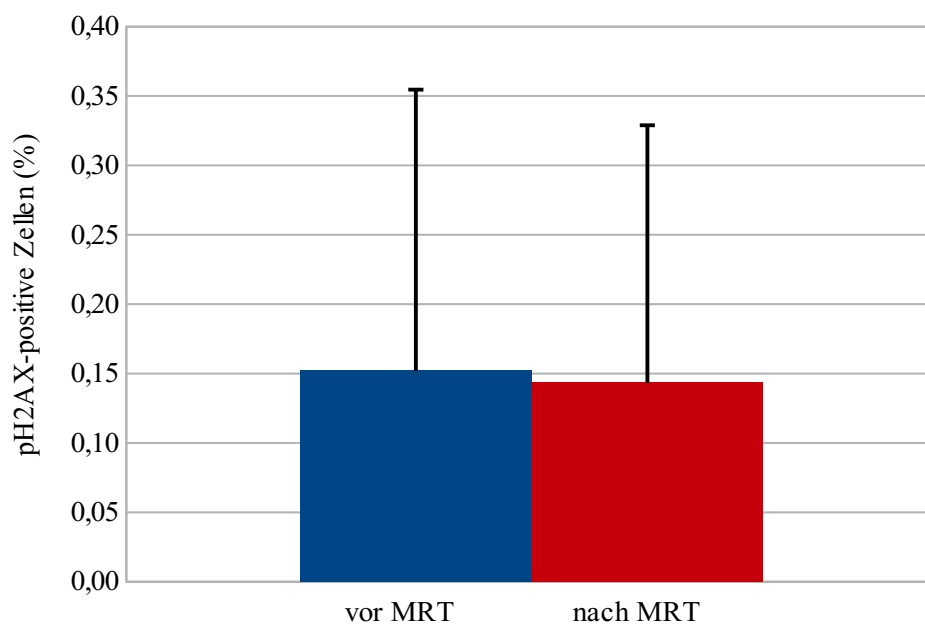


Abb. 10: Ergebnisse der FACS-Analyse

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=50) der pH2A.X-positiven Zellen in % vor MRT (0,15% pH2A.X-positiven Zellen, SD=0,20%) in blau und nach MRT (0,14% pH2A.X-positiven Zellen, SD=0,19%) in rot (p=0,39).

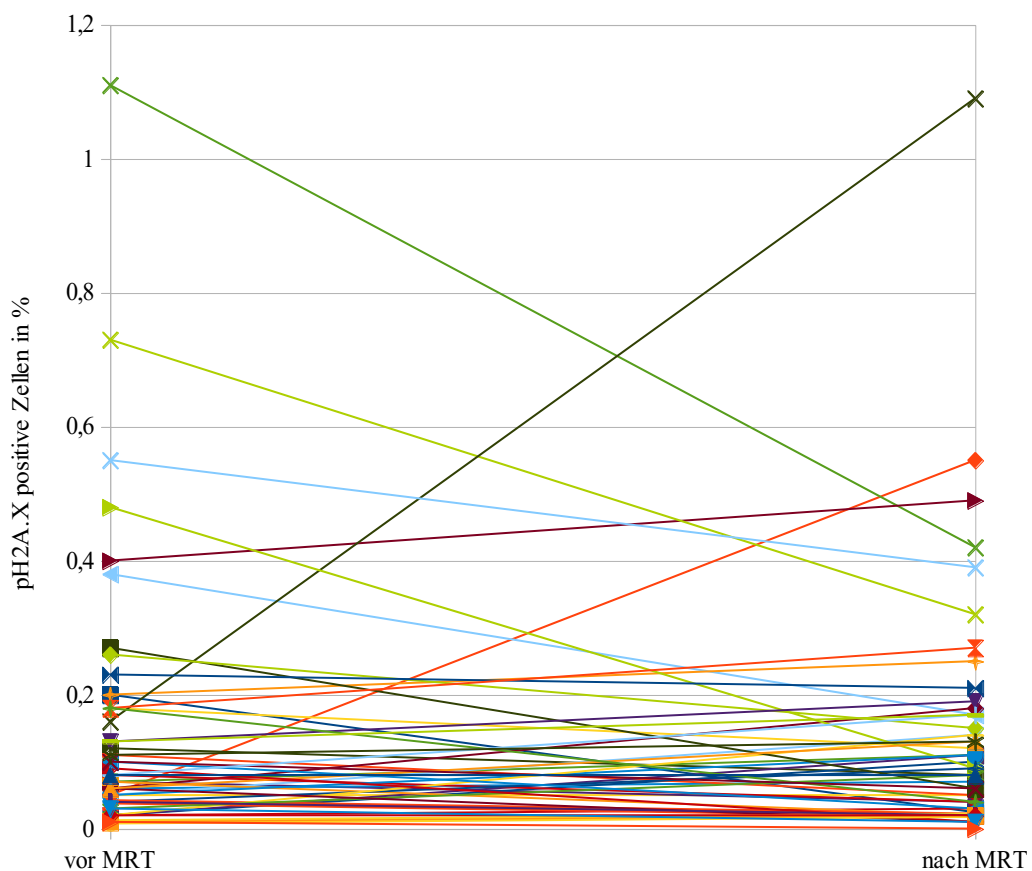


Abb. 12: Ergebnisse der FACS-Analyse der einzelnen Patienten

Dargestellt ist die Anzahl der pH2A.X-positiven Zellen in % vor und nach MRT für jeden einzelnen Patienten (n=50).

3. MATERIAL UND METHODEN

Bei der Auswertung der Proben mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie (n=46) wurden im Durchschnitt 47 ± 29 Lymphozyten ausgezählt. Hier zeigte sich ein Anstieg der DSB (Abb. 12, Abb. 13) von 0,049 DSB pro Zelle vor MRT (SD=0,022 DSB pro Zelle) auf 0,051 DSB pro Zelle nach MRT (SD=0,027 DSB pro Zelle), welcher jedoch nicht signifikant ist (p=0,21).

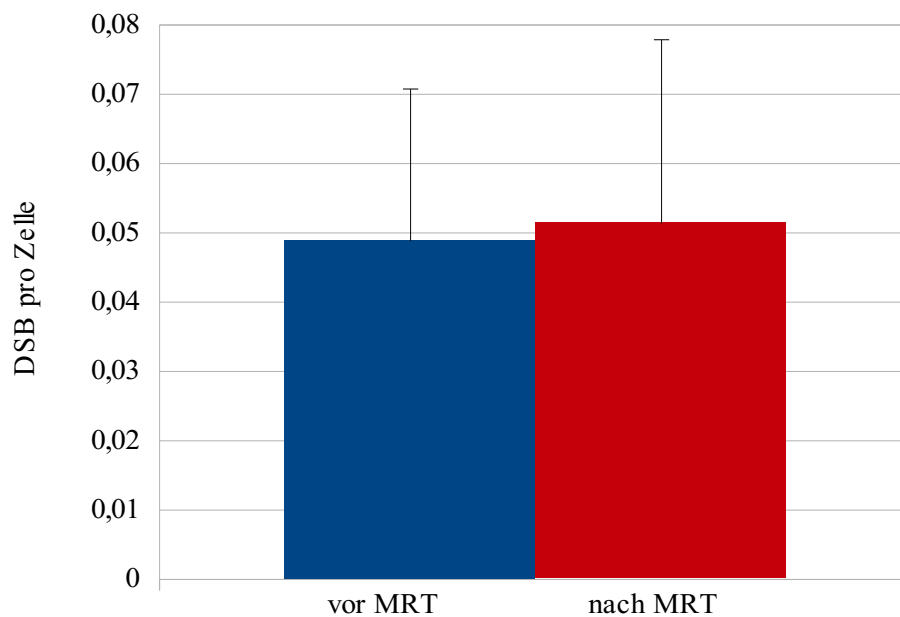


Abb. 12: Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=46) der DSB pro Zelle vor MRT (0,049 DSB pro Zelle, SD=0,022 DSB pro Zelle) in blau und nach MRT (0,051 DSB pro Zelle, SD=0,027 DSB pro Zelle) in rot (p=0,21).

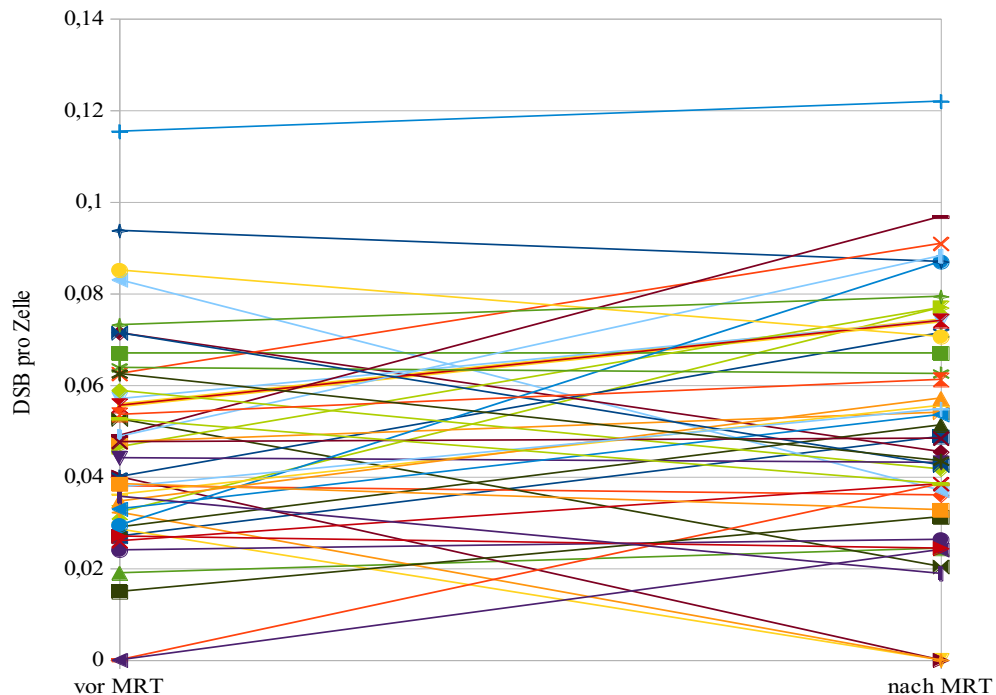


Abb. 13: Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie der einzelnen Patienten

Dargestellt ist die Anzahl der DSB pro Zelle vor und nach MRT für jeden einzelnen Patienten (n=46).

Auch in einer Subgruppenanalyse im Hinblick auf die Magnetfeldstärke konnte weder bei Untersuchungen im 1,5T MRT noch im 3T MRT eine vermehrte Anzahl von DSB festgestellt werden.

Bei 39 Patienten, welche in einem 1,5T MRT untersucht wurden, wurde kein signifikanter Unterschied der DSB vor ($0,1\% \pm 0,12\%$) und nach der MRT-Untersuchung ($0,14\% \pm 0,20\%$) ($p=0,22$) beobachtet. Auch die MFI zeigte keine signifikante Veränderung ($p=0,14$) der Intensität vor 1,5T MRT ($7,93 \text{ AU} \pm 6,04 \text{ AU}$) im Vergleich zur MFI nach 1,5T MRT ($7,11 \text{ AU} \pm 4,14 \text{ AU}$).

Ähnliche Ergebnisse ergab die Auswertung bei den im 3T MRT untersuchten zehn Patienten. Hier konnte ebenfalls keine signifikante Veränderung vor ($0,31\% \pm 0,35\%$) und nach der MRT-Untersuchung ($0,20\% \pm 0,17\%$) in Bezug auf den prozentualen Anteil pH2A.X-positiver Lymphozyten festgestellt werden ($p=0,1$), ebenso wie im Hinblick auf die MFI (vor MRT: $7,24 \pm 4,10 \text{ AU}$; nach MRT: $6,29 \pm 3,60 \text{ AU}$; $p=0,28$).

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Auszählung der DSB in der Fluoreszenzmikroskopie ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung der DSB vor und nach 1,5T oder 3T MRT-Untersuchungen. Bei 37 Patienten, die im 1,5T MRT untersucht wurden, wurden vor MRT 0,048 DSB pro Zelle (SD=0,025 DSB pro Zelle) gezählt und nach MRT 0,054 DSB pro Zelle (SD=0,027 DSB pro Zelle) ($p=0,08$). Bezüglich der Untersuchungen im 3T MRT bei neun Patienten konnte auch kein signifikanter Unterschied der DSB pro Zelle vor MRT ($0,041 \pm 0,008$ DSB pro Zelle) und nach MRT ($0,046 \pm 0,027$ DSB pro Zelle) festgestellt werden ($p=0,27$).

Die Auswertung der DSB im Hinblick auf den Einfluss des gadoliniumbasierten Kontrastmittels zeigte keine vermehrte Schädigung der DNA in Form von Doppelstrangbrüchen durch die Gabe von KM.

In der FACS-Analyse der Subgruppe ohne KM-Applikation zeigte sich ein nicht signifikanter Unterschied des Mittelwertes von 0,11% (SD=0,08%) γ -H2AX-positiver Zellen vor der Untersuchung im Vergleich zu einem Mittelwert von 0,13% (SD=0,06%) γ -H2AX-positiver Zellen nach der Untersuchung ($p=0,33$). Auch die MFI zeigte eine nicht signifikante Veränderung von $4,67 \pm 0,77$ AU auf $5,25 \pm 0,89$ AU ($p=0,08$). Bei der Auszählung der Doppelstrangbrüche im Fluoreszenzmikroskop wurden vor MRT $0,052 \pm 0,032$ DSB pro Zelle gezählt und nach MRT $0,063 \pm 0,026$ DSB pro Zelle ($p=0,05$).

Bei den Patienten (FACS: $n=43$; Fluoreszenzmikroskop: $n=39$), die eine MRT-Bildgebung mit KM erhielten, wurden weder in der FACS-Analyse (vor MRT: 0,16% γ -H2AX-positive Zellen, MFI=8,23 AU; nach MRT: 0,15% γ -H2AX-positive Zellen, MFI=7,34 AU; $p=0,10$) noch in der Fluoreszenzmikroskopie (vor MRT: 0,048 DSB pro Zelle; nach MRT: 0,049 DSB pro Zelle; $p=37$) signifikant vermehrt DSB beobachtet.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die MRT-Bildgebung des Schädels auf die DNA humaner Blutlymphozyten hat. Dafür wurde den Patienten nach Einwilligung jeweils vor und 5 Minuten nach der Untersuchung peripheres Blut entnommen. Mit Hilfe des Antikörpers γ -H2AX und einerseits automatisierter Zählung per FACS, sowie andererseits manueller Zählung im Fluoreszenzmikroskop, wurde die Anzahl an DSB vor und nach der MRT-Untersuchung quantifiziert.

Es zeigte sich in der FACS-Analyse ebenso wie in der Auszählung der fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren DSB keine signifikante Schädigung der DNA in Form von DSB fünf Minuten nach erfolgter 1,5T oder 3T MRT-Untersuchung.

Die in dieser Studie verwendete und in der Forschung etablierte Methode basiert auf der frühen Phosphorylierung des Histon H2A.X. Es liegen keine eindeutigen Daten vor, wann die Phosphorylierung des Histons genau einsetzt, doch bereits 1998 konnten Rogakou et al. [15] in einer *in vitro*-Studie fünf Minuten nach dem Einfluss ionisierender Strahlung DSB mithilfe von γ -H2AX nachweisen. Ähnliche Ergebnisse, die eine frühzeitige Phosphorylierung von H2AX in einer *in vivo*-Studie nachweisen, wurden 2012 von May et al [52] publiziert. Auch hier konnten bereits zehn Minuten nach Durchführung einer 18F-Fluorodeoxyglukose-Positronenemissionstomographie/ Computertomographie (18F-FDG-PET/CT) DSB nachgewiesen werden. Trotz widersprüchlicher Ergebnisse aktueller Studien, in denen ein Nachweis von DSB teilweise erst nach 2 Tagen möglich sein soll [54], ist davon auszugehen, dass DSB direkt nach ihrer Entstehung nachweisbar sind. Da nach der Entstehung der Doppelstrangbrüche die DNA-Reparaturmechanismen einsetzen, ist ein Abfall der γ -H2AX-Intensität nicht unwahrscheinlich und es wurden bereits nach 24 Stunden wieder γ -H2AX-Werte gemessen, die auf eine vollständige Reparatur der DSB hinweisen [55].

3. MATERIAL UND METHODEN

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten stimmen mit einigen aktuellen Studien überein [54; 56; 57]. Die Spanne der DSB pro Zelle, ermittelt mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie, von 0 DSB pro Zelle bis maximal 0,122 DSB pro Zelle deckt sich mit den aktuellen publizierten Daten von Brand et al (0,092-0,169 DSB pro Zelle) [56]. Währenddessen liegen in der Arbeit von Fiechter et al [53] weitaus größere Differenzen von 0-1,065 DSB pro Zelle vor. Ebenfalls sind dort sehr hohe Basiswerte bereits vor MRT in Höhe von 0,143 DSB pro Zelle [53] ermittelt worden. Dieser Wert liegt, obwohl er vor der MRT-Untersuchung gemessen wurde weit über dem Maximum von 0,115 DSB pro Zelle, welches in der hier vorliegenden Arbeit ermittelt wurde. Diese hohen Basiswerte sind wahrscheinlich auf Unterschiede in der Interpretation der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zurückzuführen. Da das Mikroskopieren und manuelle Auszählen der Foci in den Lymphozyten trotz großer Erfahrung der Untersucher und Verblindung weiterhin eine subjektive Methode ist, sind Verwechslungen zwischen intrazellulären Granula und γ -H2AX-positiver Foci durchaus möglich.

Der in der Studie von Fiechter et al [53] ermittelte Anstieg des Mittelwerts von 0,143 DSB pro Zelle vor MRT auf 0,270 DSB pro Zelle nach MRT lässt sich aufgrund der geringen Patientenzahl (n=20) vor allem auf einige wenige Ausnahmen mit sehr ausgeprägter Zunahme der DSB pro Zelle auf bis zu 1,065 DSB pro Zelle zurückführen. Von einer ausreichenden Erklärung für die durchschnittlich hohen Basiswerte und die enorme Zunahme der DSB pro Zelle [53] durch externe Einflüsse wie vorhergehende Untersuchungen mit ionisierender Strahlung, Chemotherapie [13] oder Leukämien ist nicht auszugehen, da diese Ereignisse in der vorliegenden Studie ebenfalls keine Ausschlusskriterien darstellten, hier jedoch nicht zu auffälligen Ergebnissen führten. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass es sich in diesen Fällen um eine individuell erhöhte Sensitivität handelt, wie sie bezüglich ionisierender Strahlung von Hamasaki et al [40] nachgewiesen wurde oder eine verminderte Aktivität der DNA-Reparaturenzyme vorliegt.

3. MATERIAL UND METHODEN

In der Vergangenheit durchgeführte Studien, in welchen DNA-Doppelstrangbrüche durch den Einfluss elektromagnetischer Felder nachgewiesen wurden, sind häufig nicht auf den klinischen Alltag anwendbar, da dort oft Expositionszeiten von 15-48 Stunden [58; 59] verwendet werden. Da solche langen Expositionszeiten im Rahmen klinischer Untersuchungen nicht vorkommen, ist ein vermehrtes Auftreten von DSB nach dem Einfluss elektromagnetischer Felder von mehr als 15 Stunden irrelevant und lässt keine Rückschlüsse auf die Toxizität und Gefährdung der Patienten zu.

Des Weiteren sollte genauer beobachtet werden, welchen Einfluss das gadoliniumbasierte Kontrastmittel auf die Entstehung von DSB hat. Aufgrund der häufig klinischen Notwendigkeit der Applikation von KM, war in der hier vorliegenden Arbeit, ebenso wie in bereits erwähnten Studien [53; 56], die Verwendung von KM kein Ausschlusskriterium. Es gibt jedoch zumindest im Rahmen von *in vitro*-Studien Anhaltspunkte für eine DNA-Schädigung durch Applikation von gadoliniumbasiertem KM [60; 61]. Diese Daten konnten in dieser Arbeit nicht verifiziert werden, da weder nach den MRT-Untersuchungen mit, noch ohne KM, ein Anstieg der DSB zu beobachten ist, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit nicht darauf hinwiesen, dass das Gadolinium einen Einfluss auf die Entstehung von DSB hat. Hier sollte jedoch erwähnt werden, dass ausschließlich makrozyklische Kontrastmittel verwendet wurden und lineare Kontrastmittel, welche zumindest durch eine schnellere Dissoziation der Chelate von den Gadolinium-Ionen ein höheres potentiell Risiko für Ablagerungen im Gehirn oder die Entstehung einer NSF im Falle einer stark reduzierten Nierenfunktion aufweisen, nicht zum Einsatz gekommen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Doppelstrangbrüche, die in humanen Blutlymphozyten entstehen, untersucht. In einer Studie von Lancellotti et al [54] wurde herausgearbeitet, dass natürliche Killerzellen (NK-Zellen) hoch sensitiv sind, um frühzeitige DNA-Schäden, verursacht durch kardiale MRT, zu detektieren. Weitere Studien mit NK-Zellen könnten somit zusätzliche Erkenntnisse bringen. Einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen der T-Lymphozyten scheint es nicht zu geben [54; 55].

3. MATERIAL UND METHODEN

Ein Defizit einiger publizierter Studien ist die fehlende Auswertung mittels Durchflusszytometrie. Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie eine hohe Sensitivität bezüglich der Detektion von Doppelstrangbrüchen aufweist, da im Gegensatz zur FACS-Analyse bereits ein einzelner Doppelstrangbruch erkannt werden kann, sollte man auch die Vorteile der Durchflusszytometrie einbeziehen.

So weist die Analyse von Doppelstrangbrüchen mittels FACS eine größere Objektivität auf als die alleinige Fluoreszenzmikroskopie, sodass hierauf nicht verzichtet werden sollte. Zusätzlich können bei der Durchflusszytometrie deutlich mehr Zellen analysiert werden, sodass genauere Daten erhoben werden. Während bei der Fluoreszenzmikroskopie die Anzahl der ausgezählten Zellen aufgrund des zeitaufwendigen und manuellen Vorgehens limitiert ist [56], werden im Zusammenhang mit der FACS-Analyse problemlos 2000 Events/Sekunde ausgewertet.

Ferner scheint die Dauer und Lokalisation der untersuchten Körperregion eine Rolle zu spielen. In einer Studie von Sak et al [62] konnte nachgewiesen werden, dass sich die Anzahl der γ -H2AX-Foci je nach bestrahlter Körperregion unterscheidet. Vor allem der Einfluss ionisierender Strahlung auf den Brustbereich, einschließlich des Herzens, erzeugte weitaus mehr DSB pro Lymphozyt als die Bestrahlung des Schädels. Überträgt man diese Daten auf die aktuelle Diskussion, wird deutlich, dass die DNA während einer kardiologischen MRT potentiell größeren externen Einflüssen ausgesetzt sein könnte, als während einer Schädel-MRT. Ursächlich für die vermehrte Entstehung von Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung könnte das erhöhte Blutvolumen, das währenddessen in dieser Körperregion fließt, sein. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung von Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten kommt hinzu, dass der Thymus als primäres, lymphatisches Organ retrosternal im Bereich des Mediastinums liegt, sodass auch Lymphozyten, die erst später in das periphere Blutsystem abgegeben werden, den externen Einflüssen ausgesetzt sind. Hierdurch wäre der späte Anstieg von Doppelstrangbrüchen nach zwei Tagen bis hin zu einem Monat [54] erklärbar. Darüber hinaus dauern kardiale MRTs mit durchschnittlich 68 ± 22 Minuten [53] deutlich länger als MRT-Untersuchungen des Schädels (17 ± 4 Minuten), wodurch zusätzlich zur Körperregion die Dauer des Aufenthalts im elektromagnetischen Feld als nachteiliger

3. MATERIAL UND METHODEN

Faktor für die DNA hinzukommt. Unterstützt werden diese Annahmen durch Studien, in denen gezeigt wurde, dass Patienten, die 1,5T MRT-Untersuchungen des Kopfes erhalten, weniger physiologische Veränderungen (z.B. geringerer Körpertemperaturanstieg) aufweisen als bei Untersuchungen andere Körperregionen [9] und dass der genotoxische Effekt der MRT abhängig ist von der Energiedosis, errechnet anhand der spezifischen Absorptionsrate (SAR), die auf den Körper während der Untersuchung Einfluss nimmt [10].

Weiterhin sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Phosphorylierung von γ H2AX auch während des normalen Zellzyklus vor allem in der M-Phase [63] und bei der Ausbildung von Replikationsgabeln [35] auftritt und nicht nur im Zusammenhang mit einer Schädigung durch externe Faktoren. Eine wichtige Voraussetzung für die Annahme, dass es sich bei den detektierten γ -H2AX-Foci ausschließlich um DSB handelt, ist die Verwendung von Zellen, die sich ohne Stimulation nicht mehr teilen [39].

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse, welche im Einklang mit weiteren Studien stehen, ist davon auszugehen, dass die MRT keine Schädigung der DNA in Form von DSB hervorruft. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine Exposition gegenüber einem magnetischen Feld im Zusammenhang mit vorangehender Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, oxidativen oder chemotoxischen Substanzen einen negativen Einfluss haben könnte. Nakahara et al [64] konnten in einer *in vitro*-Studie belegen, dass die Mikronukleus-Frequenz als Indikator für DNA-Schädigung ansteigt, wenn Zellen nach einer Bestrahlung mit 4 Gy zusätzlich einem statischen 10T Magnetfeld ausgesetzt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Arbeiten von Ikehata et al [65] und Zmyslony et al. [66], in denen ebenfalls die Ko-Mutagenität von elektromagnetischen Feldern in Gegenwart von Eisen(II)-Chlorid [66] oder chemischen Agenzien wie N-Methyl-N_x-Nitro-N-Nitrosguanidin (MNNG) [65] nachgewiesen wurden. Inwiefern diese potentiellen Effekte von starken Magnetfeldern auf klinische MRT-Untersuchungen übertragbar sind, wurde bislang noch nicht untersucht und lässt sich somit auch nicht abschließend bewerten.

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des γ -H2AX-Assays untersucht werden, ob MRT-Untersuchungen des Schädels einen potentiell kanzerogenen Einfluss in Form von Doppelstrangbrüchen auf die DNA humaner Blutlymphozyten haben.

Es lässt sich festhalten, dass es sich bei MRT-Untersuchungen des Schädels in 1,5T- oder 3T-MRT um ein sicheres diagnostisches Verfahren im Hinblick auf die Entstehung von DSB und somit potenzieller kanzerogener Effekte handelt.

Die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten fokussieren sich zweifellos nur auf MRT-Untersuchungen des Schädels und können nicht uneingeschränkt auf MRT-Untersuchungen anderer Körperregionen extrapoliert werden. Vermutlich ist eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Körperregionen möglich, da dies jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, kann hierzu keine valide Aussage getroffen werden.

Die vorliegenden Daten unterstützen somit die Hypothese, dass die klinische Anwendung der MRT unbedenklich ist oder zumindest größere Risiken ausgeschlossen werden können.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Longmore D B (1989): The principles of magnetic resonance. British medical bulletin. 45 (4); 848–880
- [2] Kauffmann, G Werner; Moser, E (2011): Radiologie. Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz. 4., völlig überarb. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer. München,
- [3] Kangarlu A, Robitaille P-M L (2000): Biological effects and health implications in magnetic resonance imaging. Concepts Magn. Reson. 12 (5); 321–359
- [4] Iwasaka M, Ueno S, Tsuda H (1994): Effects of magnetic fields on fibrinolysis. J. Appl. Phys. 75 (10); 7162
- [5] Okazaki M, Kon K, Maeda N, Shiga T (1988): Distribution of erythrocyte in a model vessel exposed to inhomogeneous magnetic fields. Physiological chemistry and physics and medical NMR. 20 (1); 3–14
- [6] Chen I I, Sana S (2015): Analysis of An Intensive Magnetic Field on Blood Flow: Part 2. Journal of Bioelectricity. 4 (1); 55–62
- [7] Elblbesy M A (2010): Effect of static magnetic field on erythrocytes characterizations. JBiSE. 03 (03); 300–303
- [8] Adair E R, Berglund L G (1986): On the thermoregulatory consequences of NMR imaging. Magnetic resonance imaging. 4 (4); 321–333
- [9] Kido D K, Morris T W, Erickson J L, Plewes D B, Simon J H (1987): Physiologic changes during high field strength MR imaging. AJR. American journal of roentgenology. 148 (6); 1215–1218
- [10] Simi S, Ballardini M, Casella M, Marchi D de, Hartwig V, Giovannetti G, Vanello N, Gabbriellini S, Landini L, Lombardi M (2008): Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. Mutat. Res. 645 (1-2); 39–43
- [11] Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M (2005): In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102 (25); 8984–8989
- [12] Kuefner M A, Brand M, Engert C, Schwab S A, Uder M (2015): Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin. 187 (10); 872–878
- [13] Bonner W M, Redon C E, Dickey J S, Nakamura A J, Sedelnikova O A, Solier S, Pommier Y (2008): GammaH2AX and cancer. Nat. Rev. Cancer. 8 (12); 957–967
- [14] Mannironi C, Bonner W M, Hatch C L (1989): H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. Nucleic acids research. 17 (22); 9113–9126

3. MATERIAL UND METHODEN

- [15] Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, Ivanova V S, Bonner W M (1998): DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (10); 5858–5868
- [16] Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008): Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36 (17); 5678–5694
- [17] Paull T T, Rogakou E P, Yamazaki V, Kirchgessner C U, Gellert M, Bonner W M (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current biology : CB.* 10 (15); 886–895
- [18] Lee J-H, Paull T T (2005): ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y.)*. 308 (5721); 551–554
- [19] Petrini, John H J, Stracker T H (2003): The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in cell biology.* 13 (9); 458–462
- [20] Jeggo P, Löbrich M (2006): Radiation-induced DNA damage responses. *Radiation protection dosimetry.* 122 (1-4); 124–127
- [21] Sedelnikova O A, Pilch D R, Redon C (2003): Involvement of H2AX in the DNA Damage and Repair Response. *cbr.* 2 (3); 231–233
- [22] Burma S, Chen B P, Murphy M, Kurimasa A, Chen D J (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276 (45); 42462–42467
- [23] Lee J-H, Paull T T (2007): Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene.* 26 (56); 7741–7748
- [24] Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis T C (2010): gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia.* 24 (4); 679–686
- [25] Scully R, Xie A (2013): Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation research.* 750 (1-2); 5–14
- [26] Bakkenist C J, Kastan M B (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 421 (6922); 499–506
- [27] Paull T T (2015): Mechanisms of ATM Activation. *Annual review of biochemistry*
- [28] Stucki M, Jackson S P (2006): gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair.* 5 (5); 534–543
- [29] Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera M A, Celeste A, Manis J P, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull T T, Alt F W, Chen J (2006): MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular cell.* 21 (2); 187–200

3. MATERIAL UND METHODEN

- [30] Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson S P, Bartek J, Lukas J (2004): Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *The EMBO journal*. 23 (13); 2674–2683
- [31] Stucki M, Clapperton J A, Mohammad D, Yaffe M B, Smerdon S J, Jackson S P (2005): MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 123 (7); 1213–1226
- [32] Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004): H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair*. 3 (8-9); 959–967
- [33] Panier S, Boulton S J (2014): Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15 (1); 7–18
- [34] Nakada S, Chen G I, Gingras A-C, Durocher D (2008): PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO reports*. 9 (10); 1019–1026
- [35] Chowdhury D, Keogh M-C, Ishii H, Peterson C L, Buratowski S, Lieberman J (2005): gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell*. 20 (5); 801–809
- [36] Keogh M-C, Kim J-A, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison J C, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, Lieberman J, Shen X, Buratowski S, Haber J E, Durocher D, Greenblatt J F, Krogan N J (2006): A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*. 439 (7075); 497–501
- [37] Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, Liao J, Dykxhoorn D M, Weinstock D M, Pfeifer G P, Lieberman J (2008): A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol. Cell*. 31 (1); 33–46
- [38] Goodarzi A A, Jonnalagadda J C, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead, Greg B G, Lees-Miller S P, Khanna K K (2004): Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *The EMBO journal*. 23 (22); 4451–4461
- [39] Löbrich M, Kiefer J (2006): Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 118 (11); 2652–2656
- [40] Hamasaki K, Imai K, Nakachi K, Takahashi N, Kodama Y, Kusunoki Y (2007): Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen*. 48 (1); 38–47
- [41] Rogakou E P, Boon C, Redon C, Bonner W M (1999): Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol*. 146 (5); 905–916

3. MATERIAL UND METHODEN

- [42] Rothkamm K, Löbrich M (2003): Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (9); 5057–5062
- [43] Sedelnikova O A, Rogakou E P, Panyutin I G, Bonner W M (2002): Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research*. 158 (4); 486–492
- [44] Knuuti J, Saraste A, Kallio M, Minn H (2013): Is cardiac magnetic resonance imaging causing DNA damage? *Eur. Heart J.* 34 (30); 2337–2339
- [45] Hande M P, Boei J J, Natarajan A T (1997): Induction and persistence of cytogenetic damage in mouse splenocytes following whole-body X-irradiation analysed by fluorescence in situ hybridization. III. Chromosome malsegregation/aneuploidy. *Mutagenesis*. 12 (3); 125–131
- [46] Huang L C, Clarkin K C, Wahl G M (1996): Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (10); 4827–4832
- [47] Khanna K K, Jackson S P (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* s27 (3); 247–254
- [48] Takata M, Sasaki M S, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*. 17 (18); 5497–5508
- [49] Hoeijmakers J H (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411 (6835); 366–374
- [50] ISEG Institut für Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitssystemforschung (2011): Barmer GEK Arztreport 2011,
- [51] Macphail S H, BanÁth J P, Yu T Y, Chu, E. H. M., Lambur H, Olive P L (2003): Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol.* 79 (5); 351–359
- [52] May M S, Brand M, Wuest W, Anders K, Kuwert T, Prante O, Schmidt D, Maschauer S, Semelka R C, Uder M, Kuefner M A (2012): Induction and repair of DNA double-strand breaks in blood lymphocytes of patients undergoing ¹⁸F-FDG PET/CT examinations. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 39 (11); 1712–1719
- [53] Fiechter M, Stehli J, Fuchs T A, Dougoud S, Gaemperli O, Kaufmann P A): Impact of cardiac magnetic resonance imaging on human lymphocyte DNA integrity. *Eur. Heart J.* 34 (30); 2340–2345
- [54] Lancellotti P, Nchimi A, Delierneux C, Hego A, Gosset C, Gothot A, Jean-Flory Tshibanda L, Oury C (2015): Biological Effects of Cardiac Magnetic Resonance on Human Blood Cells. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 8 (9); e003697

3. MATERIAL UND METHODEN

- [55] Andrievski A, Wilkins R C (2009): The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int. J. Radiat. Biol.* 85 (4); 369–376
- [56] Brand M, Ellmann S, Sommer M, May M S, Eller A, Wuest W, Engert C, Achenbach S, Kuefner M A, Baeuerle T, Lell M, Uder M (2015): Influence of Cardiac MR Imaging on DNA Double-Strand Breaks in Human Blood Lymphocytes. *Radiology.* 277 (2); 406–412
- [57] Reddig A, Fatahi M, Friebe B, Guttek K, Hartig R, Godenschweger F, Roggenbuck D, Rieke J, Reinhold D, Speck O (2015): Analysis of DNA Double-Strand Breaks and Cytotoxicity after 7 Tesla Magnetic Resonance Imaging of Isolated Human Lymphocytes. *PloS one.* 10 (7); e0132702
- [58] Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüdiger H W, Jahn O (2002): Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutation research.* 519 (1-2); 1–13
- [59] Lai H, Singh N P (2004): Magnetic-Field-Induced DNA Strand Breaks in Brain Cells of the Rat. *Environ Health Perspect.* 112 (6); 687–694
- [60] Yildiz S, Cece H, Kaya I, Celik H, Taskin A, Aksoy N, Kocyigit A, Eren M A (2011): Impact of contrast enhanced MRI on lymphocyte DNA damage and serum visfatin level. *Clin. Biochem.* 44 (12); 975–979
- [61] Cho S, Lee Y, Lee S, Choi Y J, Chung H W (2014): Enhanced cytotoxic and genotoxic effects of gadolinium following ELF-EMF irradiation in human lymphocytes. *Drug and chemical toxicology.* 37 (4); 440–447
- [62] Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrün S, Pöttgen C, Groneberg M, Stuschke M (2007): gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment. *Int. J. Radiat. Biol.* 83 (10); 639–652
- [63] Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H (2005): Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (3); 807–812
- [64] Nakahara T, Yaguchi H, Yoshida M, Miyakoshi J (2002): Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology.* 224 (3); 817–822
- [65] Ikehata M, Koana T, Suzuki Y, Shimizu H, Nakagawa M (1999): Mutagenicity and co-mutagenicity of static magnetic fields detected by bacterial mutation assay. *Mutation research.* 427 (2); 147–156
- [66] Zmyślony M, Palus J, Jajte J, Dziubaltowska E, Rajkowska E (2000): DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz). *Mutation research* 453 (1); 89-96

3. MATERIAL UND METHODEN

- [70] Reddig A, Fatahi M, Roggenbuck D, Ricke J, Reinhold D, Speck O, Friebe B (2017): Impact of in Vivo High-Field-Strength and Ultra-High-Field-Strength MR Imaging on DNA Double-Strand-Break Formation in Human Lymphocytes. *Radiology*. 282 (3); 782–789
- [71] Rogosnitzky M, Branch S (2016): Gadolinium-based contrast agent toxicity. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 29 (3); 365–376
- [72] Runge V M (2017): Critical Questions Regarding Gadolinium Deposition in the Brain and Body After Injections of the Gadolinium-Based Contrast Agents, Safety, and Clinical Recommendations in Consideration of the EMA's Pharmacovigilance and Risk Assessment Committee Recommendation for Suspension of the Marketing Authorizations for 4 Linear Agents. *Investigative radiology*. 52 (6); 317–323
- [73] Ramalho J, Semelka R C, Ramalho M, Nunes R H, AlObaidy M, Castillo M (2016): Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulation and Toxicity. *AJNR. American journal of neuroradiology*. 37 (7); 1192–1198
- [74] Radbruch A, Weberling L D, Kieslich P J, Eidel O, Burth S, Kickingeder P, Heiland S, Wick W, Schlemmer H-P, Bendszus M (2015): Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. *Radiology*. 275 (3); 783–791
- [75] Kanda T, Oba H, Toyoda K, Kitajima K, Furui S (2016): Brain gadolinium deposition after administration of gadolinium-based contrast agents. *Japanese journal of radiology*. 34 (1); 3–9

8. ANHANG

INSTITUT FÜR DIAGNOSTISCHE UND INTERVENTIONELLE RADIOLOGIE
DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Patienteninformation und Einwilligungserklärung
zur Teilnahme an der Studie (Ild.Nr. 4357- Ethik-Kommission):

Untersuchung von Doppelstrangbrüchen humaner Blutlymphozyten bei Patienten nach klinisch indizierter MRT-Untersuchung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie um Ihre Einwilligung zur Teilnahme an einem Forschungsvorhaben bitten. Hierzu erhalten Sie im Folgenden Informationen zum Ablauf des Forschungsvorhabens.

Die Teilnahme an der Untersuchung bedarf Ihrer Einwilligung. Sollten Sie weitere Fragen bezüglich der Studie haben, wenden Sie sich bitte an den aufklärenden Arzt oder direkt an PD Dr. med. Rotem Lanzman, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Uniklinikum Düsseldorf, 0211-8117754, rotem.lanzman@med.uni-duesseldorf.de

Untersuchung

Im Rahmen der Routinediagnostik wird bei Ihnen eine Magnetresonanztomographie (MRT) bzw. Computertomographie (CT) durchgeführt. Um einen möglichen schädlichen Effekt einer MRT Untersuchung zu untersuchen, führen wir z.Zt. im Rahmen einer Studie die Untersuchung von Lymphozyten („weißen Blutkörperchen“) in Ihrem Blut durch. Das Ausmaß dieser Veränderungen soll mit der CT verglichen werden. Ein unmittelbarer Nutzen ist für Sie selbst oder für die behandelnden Ärzte ist nicht unbedingt zu erwarten. Die erhaltenen Daten werden jedoch möglicherweise in Zukunft zu verbesserten und vereinfachten Untersuchungsmethoden Ihrer Erkrankung führen.

Teilnahme an der Untersuchung

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist auf die bevorstehende MRT- oder CT-Untersuchung und einer venösen Blutentnahme vor- und nach der Untersuchung beschränkt. Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen die Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile im Hinblick auf Ihre medizinische Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrem behandelnden Arzt entstehen. Bei Widerruf werden das entnommene Blut oder die isolierten Zellen unverzüglich vernichtet. Sie können aus der Studie ausgeschlossen werden, wenn es medizinische oder organisatorische Gründe notwendig machen.

Mögliche Risiken

Die MRT- oder CT-Untersuchung wird im Rahmen der klinischen Versorgung bei Ihnen durchgeführt. Zu den Risiken der Blutabnahme gehört das Entstehen blauer Flecken im Bereich der Einstichstelle. Es besteht das sehr geringe Risiko einer lokalen oder allgemeinen Infektion. In extrem seltenen Fällen kann es zu einer Verletzung eines Hautnervs, evtl. sogar mit chronischem Verlauf, kommen.

Versicherungsschutz

Der Versicherungsschutz wird über die pauschale Patientenhaftpflichtversicherung des UKD gewährleistet. Für unverschuldet auftretende Schäden sind Sie nicht versichert.

Vertraulichkeit der Daten / Datenschutz

Alle im Rahmen der Untersuchung erhobenen personenbezogenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes vertraulich behandelt. Die Weitergabe von Daten und ihre wissenschaftliche Auswertung erfolgt anonymisiert, d.h. ohne Angabe Ihres Namens und werden niemandem als auf Ihren Wunsch hin Ihnen selbst zugänglich gemacht. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität hat dieses Projekt beurteilt und festgestellt, dass keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung dieser Untersuchung bestehen.

Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

Ich wurde von dem unterzeichnenden Arzt über Art, Ziel und Ablauf der Studie und über die damit in Verbindung stehenden Risiken und Komplikationsmöglichkeiten ausführlich aufgeklärt. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, Fragen zu stellen und habe im Moment keine weiteren Fragen.

Ich erkläre mich bereit, zu den oben genannten Bedingungen an dieser Studie teilzunehmen.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des Patienten / Probanden

Ich bestätige, dass der Patient / der Proband gemäß der Patienteninformation aufgeklärt wurde und in einem Gespräch offene Fragen geklärt werden konnten.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift des aufklärenden Arztes

9. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rotem Lanzman und meinem Betreuer Prof. Dr. med. Philip Heusch ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die geduldige Betreuung bedanken. Das Wissen jederzeit auf ein offenes Ohr zu treffen und einen guten Ratschlag zu bekommen, hat mir sehr häufig weitergeholfen. Vor allem zu Beginn der Arbeit und am Ende der Fertigstellung der Dissertation konnte ich immer auf eine schnelle und hilfreiche Rückmeldung vertrauen.

In besonderer Weise gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Ron-Patrick Cadeddu, der durch seine kompetente Betreuung und die außerordentliche Hilfe bei all meinen Fragen während meiner Zeit im Labor maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Des Weiteren danke ich dem restlichen Team des hämatonkologischen Forschungslabors der Universitätsklinik Düsseldorf für die herzliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Ärzten/Ärztinnen und MTAs des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie für die gute Kooperation bei der Akquirierung der Proben. Hier möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jörg Wittsack für die Durchführung der Messungen im Kleintier-MRT zu Beginn der Arbeit bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden für den stetigen Rückhalt und ihr Vertrauen in mich in jeglicher Hinsicht.