

TUM School of Life Sciences

Kataraktentstehung aufgrund Ganzkörper-Exposition niedriger ionisierender Strahlung an Mäusen

Sarah Kunze

Vollständiger Abdruck der von der
TUM School of Life Sciences
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Harald Luksch

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Michael John Atkinson

2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Die Dissertation wurde am 26.10.2020 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die
TUM School of Life Sciences am 28.06.2021 angenommen.

**Doktorarbeit
zur Erlangung des Grades Dr.rer.nat. in Biologie**

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan

**Kataraktentstehung aufgrund von Ganzkörper-Exposition niedriger ionisierender
Strahlung an Mäusen**

Helmholtz Zentrum München
Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik
Prof. Dr. Wurst

Sarah Kunze, M.Sc. Biologie

„Der Mensch muss bei dem Glauben beharren, dass das Unbegreifliche begreiflich sei: er würde sonst nicht forschen.“ – Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung.....	7
Englische Zusammenfassung (Abstract).....	8
Ziel der Arbeit	9
Danksagung	10
1. Einleitung	11
1.1 Integrative Langzeitstudie zur Strahlenempfindlichkeit der Maus	11
1.2 Die Strahlenempfindlichkeit der Augenlinse	12
1.2 Dosislimit für die Augenlinse	13
1.3 Ionisierende Strahlung	14
1.4 Induktion/Entstehung von Katarakten	16
1.4.1 Altersabhängige Katarakte	17
1.4.2 Strahleninduzierte Katarakte.....	18
1.5 Das Gen <i>Ercc2</i>	19
1.6 Die Mausmutante <i>Ercc2 / RCO015</i>	20
2. Materialien	22
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.2 Verwendete Puffer und Lösungen	23
2.3 Verwendete Antikörper	25
2.4 Geräte	26
2.5 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.6 Software	28
2.7 Mauslinien.....	28
2.8 Kunststoff-eingebettete Augen aus der Lifetime-Studie.....	29
3. Methoden	30
3.1 Histologie und Immunhistochemie von Augen.....	30
3.1.1 Fixierung und Einbettung von Augen in Plastik und Anfertigung von Schnitten.....	30
3.1.2 Übersichtsfärbung mit Metylenblau-basisches Fuchsin	30
3.1.3 Statistische Auswertung der Histologie	31
3.1.4 Immunhistochemische Färbungen von Plastik-Schnitten	31
3.2 Linsenorgankultur	32
3.2.1 Präparation von Linsen	32
3.2.2 Bestrahlung von Linsen	33
3.2.3 Einbettung und Schneiden von Linsen in Paraffin.....	33
3.2.4 Färbung von Paraffin-Schnitten	34

Inhaltsverzeichnis

3.2.5 Analyse von Doppelstrangbrüchen	34
3.2.6 Apoptose-Färbung.....	35
3.3 Metabolomics von bestrahlten Linsen und Plasma.....	35
3.3.1 Vorbereitung der Proben und Messung	35
3.4.2 Auswertung	36
4. Ergebnisse	38
4.1 Histologische Untersuchungen der Augen bestrahlter Mäuse in Hinblick auf die Kataraktentstehung.....	38
4.1.1 Befundung 4 h nach Bestrahlung	42
4.1.2 Befundung 12 Monate nach Bestrahlung.....	44
4.1.3 Befundung 18 Monate nach Bestrahlung.....	46
4.1.4 Befundung 24 Monate nach Bestrahlung.....	48
4.1.5 Statistische Erfassung der Histologie.....	49
4.2 Immunhistochemische Ergebnisse 8-OHG	54
4.3 Immunhistochemische Ergebnisse DNaseII β	56
4.4 Immunhistochemische Ergebnisse Ki67	57
4.5 Ergebnisse Linsenorgankultur.....	59
4.6 Ergebnisse Metabolomics	63
4.6.1 Ergebnisse der Linsen	63
4.6.2 Ergebnisse des Plasmas.....	66
5. Diskussion.....	69
5.1 Posteriore Katarakte in histologischen Schnitten.....	69
5.2 Immunhistochemische Färbungen zeigen keine Veränderungen	72
5.2.1 ROS.....	72
5.2.2 Linsendifferenzierung	73
5.2.3 Proliferation	74
5.3 Auswirkungen von niedrigen Strahlendosen auf Linsen in Organkultur	75
5.6 Metabolomik-Analysen zeigen Alterungseffekt in Linsen und keinen Unterschied im Plasma	76
Ausblick	78
Abbildungsverzeichnis:.....	80
Tabellenverzeichnis:.....	82
Literaturverzeichnis	83
Anhang.....	92

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

8-OHG	8-Hydroxyguanosin
53BP1	p53 Bindeprotein 1
Abb.	Abbildung
ad	lat. „bis auf/zu“ (Maßbestimmung)
ASC	anteriore subkapsuläre Katarakt (anterior subcapsular cataract)
Atm	Ataxia telangiectasia mutiertes Gen
bp	Basenpaar/e
BSA	Bovines Serum Albumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
Co	Cobalt
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
DAPI	4',6-diamidino-1-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch (double-strand break)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ENU	Ethyl-Nitroso-Harnstoff (ethyl-nitroso-urea)
EtOH	Ethanol
<i>Ercc2</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
F1	Filialgeneration 1
FBS	fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2)
FIA-MS/MS	Fließinjektionsanalyse mit Massenspektrometrie-Kopplung
Gy	Gray (Einheit Strahlendosis)
h	Stunden (v. lat. hora)
HCl	Salzsäure
HMGU	Helmholtz Zentrum München
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Ki67	Antigen Ki-67
LC-MS/MS	Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LECs	Linsenepithelzellen (in Kultur)
M	Molar
M	Monat/e
m	männlich
m	milli
MGI	Mouse Genome Informatics (http://www.informatics.jax.org)
min	Minute/n
Mrad9	Murines DNA-Reparaturprotein Rad9
mRNA	(messenger) Boten-Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

Mut	Mutante
n.B.	nach Bestrahlung
NER	Nukleotidexzisionsreparatur (nucleotide excision repair)
OCT	Optische Kohärenztomographie
OFZ	Organell-freie Zone
OR	Chancenverhältnis (Odds Ratio)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclei-Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pde6b ^{rd1}	Phosphodiesterase 6 b, Retinadegeneration 1 (retinal degeneration)
PFA	Paraformaldehyd
PSC	posteriore subkapsuläre Katarakt (posterior subcapsular cataract)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen-species)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SN	Sehnerv
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
V	Volt
VE-Wasser	deionisiertes Wasser
v/v	Volumenprozent
w	weiblich
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht in Volumen
XPD	Xeroderma Pigmentosum, (homologe Genbezeichnung <i>Ercc2</i>)
XRCC1	Röntgen-Reparatur komplementäres Protein 1
z.B.	zum Beispiel
γH2AX	phosphoryliertes Histon-2

Nomenklatur:

Gensymbole sind kursiv (*xpd*) geschrieben und Proteine groß (XPD). Humane Gene (*XPD*) sind groß und kursiv, murine Gene (*Ercc2*) werden mit großem Anfangsbuchstaben und kursiv geschrieben.

Zusammenfassung

Diese Arbeit geht der Fragestellung nach ab wann ein Risiko für eine Kataraktentstehung vorliegt und ob die eingeführten Grenzwerte von 20 mSv/Jahr für die Linse ausreichend Schutz über das gesamte Berufsleben bieten. Dafür wurde die Lifetime Studie (Dalke et al., 2018) experimentell ausgewertet, die die Auswirkungen von einmaliger niedrigen Strahlendosen ionisierender Strahlung bei Wildtyp- und *Ercc2^{+/-}*-Mäusen untersucht. In dieser Lebenszeitstudie wurden 10 Wochen alte Mäuse mit einer Dosisrate von 0,063 Gy/min (Cobalt-60-Quelle) Ganzkörper-bestrahlt. Die verwendeten Dosen betragen 0 Gy (Scheinbestrahlung/Kontrollen); 0,063 Gy; 0,125 Gy und 0,5 Gy. Es wurden jeweils die Zeitpunkte 4 und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate nach der Bestrahlung untersucht.

Die histologischen Untersuchungen gaben einen Überblick über morphologische Veränderungen in der Linse über den Lebenszeitraum bis 24 Monate nach der Bestrahlung. Untersucht wurden im Detail jeweils der anteriore Bereich, der Linsenbogen und der posteriore Bereich. Besonders auffällig war die Anhäufung von posterior subkapsulären Katarakten bei Tieren, die mit 0,5 Gy bestrahlt wurden. Dies belegt, dass bereits bei einer geringen Dosisrate von 0,063 mGy/min schon ab einer Dosis von 0,5 Gy Katarakte im späteren Lebensverlauf entstehen können und ist damit das wichtigste Ergebnis dieser Studie im Hinblick auf das Risiko für die Augen. Außerdem wurden kleine Veränderungen, wie vergrößerte oder geschwollene Faserzellen, kleine Vakuolen, Risse oder delokalisierte Zellkerne bei allen Dosisgruppen beobachtet.

Die metabolischen Analysen ergaben für die Linse einen sehr starken Alterungseffekt, der etwaige Strahlungs- oder Genotyp-Unterschiede überlagerte. Es konnte gezeigt werden, dass im Alter eine Zunahme von Phospholipiden und Sphingomyelinen in der Linse auftrat. Die Analysen des Plasmas zeigten weder einen Alterseffekt noch einen Strahleneffekt.

Die Untersuchungen von Linsen in Organkultur deutete durch eine starke Anfärbung des Linsenepithels mit einem Antikörper gegen γ H2AX auf apoptotische Vorgänge in der Linsenorgankultur hin. Da, dies auch bei den Kontrollen (0 Gy) auftrat, konnte aus diesen Versuchen keine Aussage über Schäden und Reparatur des Linsenepithels nach Bestrahlung getroffen werden.

Diese Arbeit unterstützt das niedrige Dosislimit von 20 mSv/Jahr, da hier ein signifikantes Auftreten von posterior subkapsulären Katarakten nach 0,5 Gy nachgewiesen werden konnte.

Englische Zusammenfassung (Abstract)

The dose limit for the eye lens has been set at 20 mSv per year for radiation-exposed people. This thesis examines an experimental evidence to determine if this low dose limit is reasonable and what effects low-dose irradiation have on in the eye lens. For this purpose the lifetime study (Dalke et al., 2018) was used to determine long-lasting effects after a short-term whole-body exposure to low-dose ionizing radiation in wild-type and *Ercc2*^{+/-} mice. These mice were irradiated with a dose of 0,063 Gy/min from a Cobalt-60-source. Doses used were 0 Gy (sham irradiation, controls), 0.063 Gy, 0.125 Gy and 0.5 Gy. Eyes were examined at 4 h, 24 h and 12, 18 and 24 months after irradiation.

The histological analyses showed a number of aberrations in the lens developing in both genotypes up to 24 months after irradiation. The anterior region, the lens bow region and the posterior part of the lens were analyzed in detail. The main finding of this study was that 0.5 Gy irradiated mice developed a significantly increased numbers of posterior subcapsular cataracts. This confirms that exposure to low doses of radiation can lead to cataract formation later in life. A number of minor changes, including swollen/enlarged fiber cells, small vacuoles, fissures and mislocalized cell nuclei were found in the histological analyses of all samples. These findings did not correlate with dose or genotype.

The metabolomic analysis of the lenses showed a strong effect of age. This overlays possible radiation or genotype effects. The metabolic analyses of the plasma showed no radiation or aging effect.

The examination of the lens in organ culture showed surprisingly a strong staining for DNA damage marker γ H2AX in the non-irradiated lens epithelium cells, which implied ongoing DNA damage through apoptotic reactions. No conclusions of additional DNA-damage and/or repair after irradiation could be derived from these experiments.

This work suggests that the dose limit of 20 mSv per year should be maintained to prevent posterior subcapsular cataracts later in life as an expected working life of 30 years would sum up to around 600 mSv which equals a dose of 0,6 Gy.

Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit des Auges, insbesondere der Linse, in Bezug auf niedrige Dosen ionisierender Strahlung über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 24 Monate nach der Bestrahlung. Durch das Herabsetzen des Dosislimits für die Augenlinse auf 20 mSv pro Jahr, ist deren Strahlenempfindlichkeit wieder in Diskussion geraten und bedarf dringend wissenschaftlicher Nachweise. Es stellt sich die Frage, ob ein Dosislimit von 20 mSv/Jahr für exponiertes Personal einen ausreichenden Schutz vor der Entwicklung von Katarakten bietet. Geht man von 30 Jahren Berufsleben aus, so ergibt sich eine Gesamtdosis von 600 mSv. Das entspricht einer aufgenommenen Dosis von 0,6 Gy in der Linse. Mit unseren Experimenten wollen wir überprüfen, ob eine einmalige Bestrahlung von bis zu 0,5 Gy ausreicht, um im späteren Lebensverlauf die Entstehung von Katarakten auszulösen. Besonders im Fokus steht die Entstehung der posterior subkapsulären Katarakte, die vor allem in Verbindung mit Strahlung auftreten können. Dazu dienten vorrangig histologische Untersuchungen von Schnitten der Augen. Außerdem wurden immunhistochemische Analysen zur genaueren Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit durchgeführt, sowie Doppelstrangbruchanalysen mit Hilfe ganzer Linsen in Organkultur. Ein weiterer Untersuchungsaspekt war die Erfassung metabolischer Veränderungen in Linsen und im Plasma nach Bestrahlung.

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jochen Graw, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit am Institut für Entwicklungsgenetik im Helmholtz Zentrum München anzufertigen. Ich bedanke mich auch für die Bereitstellung des interessanten Themas und die vielen anregenden und ergebnisreichen Diskussionen. Genauso möchte ich mich für das immerwährende Interesse an meiner Arbeit und meinem Fortschritt danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Claudia Dalke für die Bereitstellung des Themas und die Anfertigung der Lifetime Study, durch die meine Arbeit überhaupt erst möglich geworden ist. Auch bei ihr möchte ich mich für stetige Hilfsbereitschaft, Diskussionen und Ratschläge bedanken. Als meine Mentorin hatte sie eine besondere Aufgabe während meiner Doktorarbeit, dafür möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ich danke meinem Thesis Committee, Prof. Dr. Michael Atkinson und Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die Begleitung während der Doktorarbeit und das Feedback bei den Thesis Committee Meetings und das Interesse an meiner Arbeit. Im Besonderen möchte ich Prof. Atkinson für die Übernahme der Doktorarbeit danken!

Ich möchte mich bei meinen Mitdoktoranden, Sharmilee Vetrivel und Daniel Pawliczek, bedanken. Ihr wart stets hilfsbereit, offen für Diskussionen und habt mir bei der alltäglichen Bewältigung der Doktorarbeit zur Seite gestanden. Es ist schön gewesen, mit euch gemeinsam diesen Weg zu beschreiten!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Erika Bürkle und Monika Stadler für die stetige Hilfsbereitschaft und das Züchten der Mäuse bedanken.

Mein Dank geht auch an Dr. Oana Veronica Amarie, die mir mit ihrer Erfahrung stets für Tipps und Hilfe zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt Frau Elenore Samson aus der Pathologie, die mir durch exzellente technische Assistenz bei vielen Problemen geholfen hat und durch ihre Expertise mir stets helfen konnte.

Ich möchte auch meinen Kooperationspartnern von der Augenklinik München, Prof. Stephan Thureau, Prof. Gerhild Wildner und Dr. Ohlmann für die Zusammenarbeit und insbesondere die pathologische Begutachtung der Schnitte danken.

Für die Nutzung des konfokalen Mikroskops möchte ich mich bei Dr. Anja Zeigerer und Susanne Seitz vom Institut für Diabetes und Cancer bedanken.

Ich möchte mich beim Institut für Strahlenbiologie für die Nutzung des Keyence Mikroskops bedanken, aber vor allem für die Hilfe bei den Doppelstrangbruchanalysen.

Ich bedanke mich bei dem Genom Analyse Zentrum (GAC), besonders bei Prof. Dr. Jurek Adamski, Dr. Cornelia Prehn, Dr. Gabrielle Möller, Dr. Alexander Cecil und Silke Becker für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Analyse der Metabolomics-Daten.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, die mir trotz der Entfernung stets eine Stütze waren.

Ein besonderer Dank gilt den kleinen „Mäusen“ Ben, Hannah, Lea und Elisa.

1. Einleitung

1.1 Integrative Langzeitstudie zur Strahlenempfindlichkeit der Maus

Die INSTRA (Integrative Langzeitstudie zur Strahlenempfindlichkeit der Maus) analysiert die Proben, die durch die Lifetime Studie (Dalke et al., 2018) gewonnen wurden. In dieser Studie wurden Mäuse im Alter von 10 Wochen mit einer Cobalt-60-Quelle ganzkörper-bestrahlt. Die Dosisrate betrug 0,063 Gy/min und es wurden Mäuse mit 0 Gy (Kontrolle bzw. Scheinbestrahlung) und den Dosen 0,063 Gy, 0,125 Gy und 0,5 Gy bestrahlt.

Es wurde jeweils ein Wildtyp-Stamm (C57BL/6JG x C3HeB/FeJ) und eine heterozygote *Ercc2*^{+/-}-Mutante (siehe Kapitel 1.7) mit gleichem Stammbhintergrund, sowohl weibliche als auch männliche Tiere, sodass pro Dosis vier Gruppen untersucht wurden. Um frühzeitige Strahlenschäden zu erkennen, wurden Mäuse 4 h und 24 h nach der Bestrahlung abgetötet und deren Organe zur weiteren Untersuchung entnommen. Spätere Zeitpunkte für die Untersuchung von Strahlenschäden waren 12, 18 und 24 Monate nach der Bestrahlung. Für Verhaltensversuche wurde noch eine Gruppe mit 0 und 0,5 Gy nachgeschoben, die die Veränderungen 6 Monate nach der Bestrahlung aufzeigt. Diese wurden in dieser Doktorarbeit aufgrund der fehlenden Dosen von 0,063 Gy und 0,125 Gy nicht weiter berücksichtigt, wenauch die Proben histologisch ohne Auffälligkeiten gesichtet wurden.

An dieser Studie sind eine Vielzahl an Gruppen beteiligt, die jeweils verschiedenen Organe bearbeiten. Zur Lebenszeit wurden Verhaltenstests mit den Tieren gemacht, um den Einfluss auf das Gehirn zu verstehen (HMGU Arbeitsgruppe Hölter-Koch). Blut wurde alle 4 Monate entnommen und analysiert. Im gleichen Rhythmus wurden die Tiere ophthalmologisch untersucht. Es wurde die Linsendichte mittels Scheimpflug gemessen und die Retina mit optischer Kohärenztomographie (OCT) aufgenommen.

Nach dem Versuchsende wurden die Tiere abgetötet und die Organe entnommen. Dazu zählten Blut, Gehirn, Augen, Herz, Pankreas, Leber, Milz und Schilddrüse. In der INSTRA-Studie erfolgte die Analyse der jeweiligen Organe durch die jeweiligen beteiligten Gruppen. Diese Arbeit befasst sich mit der Auswertung der gesammelten Augen in Hinblick auf die Kataraktentstehung aufgrund niedriger Strahlendosen bis 0,5 Gy.

1.2 Die Strahlenempfindlichkeit der Augenlinse

Die Linse im Auge gilt als besonders empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung (Kimura & Ikui, 1951) und kann als Folge von Strahlenschäden Katarakte entwickeln. Besonders das Linsenepithel (siehe Abb.1) gilt als strahlenempfindlich, weil die Linsenepithelzellen in der germinativen Zone eine hohe Proliferationsrate aufweisen (Srinivasan & Harding, 1965). Der Aufbau des Auges begünstigt diesen Umstand dadurch, dass lediglich die Cornea und die flüssigkeitsgefüllte vordere Augenkammer die Strahlung abfangen, bevor sie auf das Linsenepithel trifft. Dadurch ist die eintretende Strahlung immer noch relativ stark und kann im Linsenepithel zu Schäden führen. Dies können Doppelstrangbrüche, aber auch reaktive Sauerstoffspezies sein, die die Linsenepithelzelle in ihrer Differenzierung zur Linsenfaserzelle massiv stören können (von Sallmann, 1952; Hanna & O'Brien, 1963). Eine beschädigte Zelle wird in der Linse nicht ersetzt und die Linsenfaserzellen bleiben nach ihrer Differenzierung ein Leben lang bestehen und müssen ohne Zellorganellen und Zellkern auskommen (Bassnett, 2011). Daraus folgt, dass Schäden akkumulieren und nur begrenzt repariert werden können (Tretton et al., 1979). Dies kann im späteren Verlauf dazu führen, dass Katarakte entstehen (Jose, 1978).

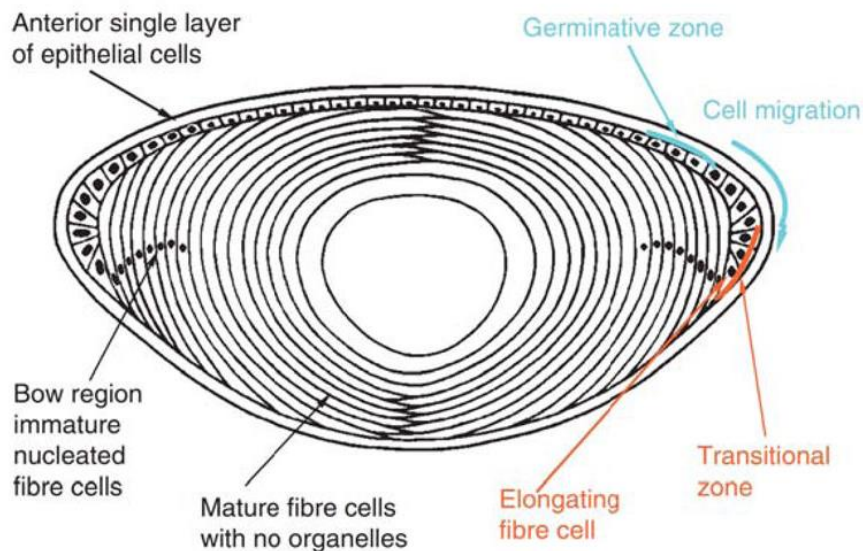


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Linse mit der anterioren Einzelzellschicht aus Linsenepithelzellen, der Linsensbogenregion (lens bow) und den ausdifferenzierten Faserzellen ohne Zellorganellen. Es wird auch die germinative Zone und die Übergangszone (transition zone) gezeigt, in der die Zellen migrieren und dann zur Linsenmitte elongieren. Nach: Kate L. Moreau and Jonathan A. King "Protein Misfolding and Aggregation in Cataract Disease and Prospects for Prevention" Trends Mol Med. 2012

Einleitung

Bereits in frühen Studien mit Ratten konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung von Strahlung zur Kataraktentstehung führen kann (Merriam & Focht, 1962). Außerdem ist aus den Studien der Atombomben-Überlebenden von Hiroshima und Nagasaki bekannt, dass Strahlung gehäuft zur Kataraktentstehung beiträgt (Minamoto et al., 2004; Nakashima et al., 2006). Weitere Studien zeigen u.a., dass beruflich exponiertes Personal wie interventionelle Radiologen und Piloten, ein höheres Risiko für Katarakte aufweisen (Vano et al., 2010; Kim & Lee, 2007).

Trotz des Wissens um die Korrelation zwischen Strahlung und Kataraktentstehung ist nicht bekannt welcher Mechanismus hinter der Kataraktentstehung steht (Ainsbury et al., 2018). Es ist auch nicht bekannt, ob ein lineares Modell oder ein Schwellenmodell der Dosis-Wirkung-Beziehung zutreffend sind (Hamada et al., 2014; Aleta, 2009). Daher ist der Effekt bei niedrigen Dosen nicht bekannt.

Die Linse wird zuweilen auch als das strahlenempfindlichste Organ im Körper betrachtet (Brown, 1997; Hamada, 2017), was eine frühere Publikation dieser Studie (Dalke et al., 2018) aber bereits widerlegen konnte. Es konnten nur geringe Effekte in der Linse beobachtet werden, aber besonders viele Tiere wiesen Tumore auf und auch 50 % der 0,5 Gy bestrahlten Tiere sind bereits vor dem Versuchsende von 24 Monaten nach Bestrahlung verstorben und wiesen damit eine höhere Mortalität als die Kontrollgruppe auf. Damit konnte gezeigt werden, dass einige Organe (wie etwa die Eierstöcke) strahlenempfindlicher als die Linse sind. Da Tumore aber vielfältige Ursachen haben können, ist es wichtig, die Linse weiterhin als Marker für Strahlenexposition zu diskutieren und zu untersuchen (Ainsbury et al., 2016).

1.2 Dosislimit für die Augenlinse

Durch die besondere Empfindlichkeit der Augenlinse gegenüber Strahlung (siehe 1.1), gibt es Richtlinien für die Exposition der maximalen Strahlendosis am Auge von exponierten Personen. Dies soll dazu beitragen, dass eine Kataraktentstehung verhindert wird (Bouffler et al., 2012). Der Schwellenwert für die Entstehung von Katarakten wird bei 0,5 Gy angesetzt (ICRP Bericht 2011). Die experimentelle Bestätigung dieser Dosis als Schwellenwert gilt es zu belegen, was die zentrale Bedeutung dieser Arbeit hervorhebt. Die niedrige Strahlendosis von 63 mGy/min und die geringen Dosen zwischen 0,063 Gy und 0,5 Gy können daher einen genaueren Einblick zum Schwellenwert für die Kataraktogenese und die Entstehung von Katarakten liefern. Außerdem soll es auch bei der Frage helfen, ob es überhaupt einen Schwellenwert gibt, denn auch das wird kontrovers diskutiert (Thome et al., 2018; Vano et al., 2008).

Einleitung

Die internationale Strahlenschutz-Kommission ICRP hat 2015 in ihrer 118. Veröffentlichung das Limit für die maximale Strahlendosis am Auge auf 20 mSv pro Jahr herabgesetzt (zuvor 50 mSv/Jahr). Dabei darf innerhalb von 5 Jahren kein Wert 50 mSv überschreiten.

Für beruflich nicht exponierte Personen gilt weiterhin die Empfehlung der Strahlenschutzdosis von 15 mSv/Jahr. Dort wird ein Herabsetzen der Maximaldosis nicht für notwendig gehalten, da es ohnehin unter dem Wert von 20 mSv für beruflich exponiertes Personal liegt und es keine Annahmen für eine höhere Strahlenbelastung gibt (siehe dazu auch www.icrp.org, www.bfs.de)

1.3 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung ist eine Art von Energietransport in Form von Wellen oder Teilchen. Diese Energie ist in der Lage Elektronen aus anderen Atomen herauszuschlagen und damit die Eigenschaften des Atoms zu verändern. Ionisierende Strahlung wird unterteilt in Alpha-, Beta- und Gammastrahlung, sowie Neutronen- und Röntgenstrahlung (Adamietz und Nicolas, 2008). In dieser Arbeit wurde Gammastrahlung verwendet, weshalb darauf im Besonderen eingegangen wird.

Alphastrahlung besteht aus zwei Protonen und zwei Neutronen und kann somit als Heliumatomkern bezeichnet werden (Stolz, 2005). Dieser hat eine große Masse, aber nur eine geringe Reichweite und gibt seine Energie sehr schnell ab, wodurch er bei Inkorporation das Gewebe besonders stark schädigen kann (Heisenberg, 1947). Eine mögliche Aufnahmequelle ist z.B. Radon in der Atemluft (Seichert, 1992). Alphastrahlung lässt sich aber leicht abschirmen, etwa durch ein Blatt Papier (Bojahr et al., 2006).

Betastrahlung entsteht beim Zerfall von Atomkernen, wo entweder Elektronen (negativ geladene Teilchen) oder Protonen (positiv geladene Teilchen) ausgesendet werden (Stolz, 2005). In der Luft ist die Reichweite wenige Zentimeter bis Meter. Betastrahlung kann durch ein dünnes Aluminiumblech abgeschirmt werden (Thümmel, 1976). Im Gewebe gibt sie ihre Energie je nach Dosis über eine Distanz von wenigen Millimetern bis Zentimetern ab (Krieger, 2013). Durch Inkorporation kann es zu einer erheblichen Strahlenbelastung kommen, allerdings ist diese weniger schädlich als von Alphastrahlung (Bonné, 2016).

Gammastrahlung ist Strahlung in Form von elektromagnetischen Wellen und ist sehr energiereich (Schönfelder, 1991). Je kürzer die Wellenlänge ist, desto energiereicher ist die Strahlung (Grunert, 2019). Sie entsteht durch den radioaktiven Zerfall von Atomkernen. Häufig wird dabei auch Alpha- und Betastrahlung freigesetzt. Die Reichweite von Gammastrahlung ist sehr hoch und die

Einleitung

Abschirmung ist mithilfe von Blei und Beton sehr aufwändig (Kolb und Kolb, 1970). Die äußere Einwirkung ist schädlich, da Gammastrahlen tief ins Gewebe eindringen können (Schmitt, 1979). Durch die Absorption vom Gewebe entsteht wiederum Betastrahlung als Sekundärstrahlung, was zu einer Kaskade von ionisierender Strahlung führt, die chemische Bindungen aufbrechen (Meyer und Schweidler, 2013). Dies ist besonders bei proliferierenden Zellen problematisch und führt zu Schäden, insbesondere bei Makromolekülen wie dem Erbgut (Gajdusek et al., 1996). Dies führt bei Zellteilungen zu Problemen, wie beispielsweise eine verringerte Anzahl an Blutzellen, wodurch eine Strahlenkrankheit auch erst nach einiger Zeit tödlich sein kann (Sudprasert et al., 2006). Die Teilungsfähigkeit der Zellen kann aber auch erhalten bleiben und zu einem unkontrollierten Wachstum und damit zum Entstehen von malignen Tumoren führen (Norpoth und Woitowitz, 2006). Neutronenstrahlung sind subatomare Teilchen und werden bei der Kernspaltung von schweren Atomen, wie etwa Uran, freigesetzt (Krieger, 2009). Die Abschirmung ist sehr aufwändig, da die Teilchen zunächst abgebremst werden müssen, um sie anschließend einzufangen. Dabei wird Gammastrahlung freigesetzt, die mit Blei abgeschirmt werden muss (Jaeger, 1960).

Röntgenstrahlung ist elektromagnetische Strahlung, die technisch durch das Abbremsen von schnellen Elektronen an einer Anode erzeugt wird (Heuck, 1995). Auch der Zerfall radioaktiver Atomkerne kann Röntgenstrahlung erzeugen, wenn sich dabei das Element ändert und die freiwerdende Energie aus der Elektronenhülle freigesetzt wird (Reiser, 2011).

Die Energiedosis wird in Gray (Gy) angegeben (Stolz, 2005). Sie gibt die Strahlenwirkung in Materialien unter Berücksichtigung des Gewebefaktors an. Strahlung wird in Sievert (Sv) angegeben, was Joule durch Kilogramm entspricht (Pfalzner, 1983). Die jährliche Strahlenbelastung liegt bei etwa 2,4 mSv (Schmiermund, 2019). Sie setzt sich durch natürliche Strahlung und medizinische Strahlung zusammen. Krankheitsverursachende Strahlenschäden können entstehen, wenn eine Schwellendosis von 200-300 mSv überschritten wird (Laskowski, 2019). Bei höheren Dosen kann dies zu akuten Symptomen wie Übelkeit, Entzündung der Schleimhäute, Fieber und Veränderungen im Blutbild führen. Spätschäden können Leukämie, Unfruchtbarkeit und Katarakte sein (Kiefer, 1989). Geringe Strahlendosen werden ein positiver Effekt zugesprochen (Hormesis), da sie die Zellreparatur anregen (Luckey, 1991). In der Tat sind Zellen im Allgemeinen fähig, Schäden durch Strahlung zu reparieren (Elkind, 1979). Ionisierende Strahlung kann zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA führen (Dugle et al., 1976). Außerdem können freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies) gebildet werden oder Proteine geschädigt werden (Liebel et al., 2012). Langfristige Schäden können durch falsche oder nicht erfolgte Reparatur entstehen (Parshad et al., 1996).

1.4 Induktion/Entstehung von Katarakten

Katarakte, auch Grauer Star genannt, sind Trübungen der Augenlinse (Stürmer, 2009). Sie sind weltweit die häufigste Ursache für Erblindung (Liu et al., 2017). Die Trübung entsteht durch Proteinaggregate in der Linse, wodurch die Transparenz beeinträchtigt wird und somit die Sicht behindert wird (Pirie, 1968). Die klare Struktur der Linse ist essentiell für das Sehen, da das Licht in der Linse gebündelt wird und auf die Retina projiziert wird (Bassnett et al., 2011). Der Brechungsindex ist daher so gering wie möglich zu halten (Benedek, 1971). Dies wird durch die Differenzierung der Linsenepithelzellen zu Linsenfaserzellen sichergestellt (Bassnett et al., 2011). Dabei werden der Zellkern und die Zellorganellen abgebaut, während die Zellen Richtung Linsenmitte wandern (Bassnett, 1997; Bassnett et al., 2011). Die Zellen elongieren dabei und lagern sich auf bereits vorhandene Zellen auf, wodurch eine zweibelartige Struktur entsteht (Coulombre & Coulombre, 1963). Linsenfaserzellen bleiben ein Leben lang erhalten, sodass der innere Linsenkern (Nucleus) bereits bei der Geburt vorhanden ist (Rabaey, 1965). Um die Transparenz der Linse zu ermöglichen, sind die Faserzellen mit bestimmten Proteinen gefüllt: den Kristallinen (Delaye & Tardieu, 1983). Es gibt α -, β - und γ -Kristalline, die jeweils noch weiter unterteilt sind (Wistow & Piatigorsky, 1988). Sie sind wasserlöslich und machen 35 % des Gesamtgewichts des Auges aus (Graw, 1985). Linsenkristalline werden von zentralen und posterioren Faserzellen synthetisiert (Gilbert, 2000). Die β -Kristalline nehmen im Alter zu, während die α - und γ -Kristalline weniger werden (Bours & Hockwin, 1977). Bei der Maus sind acht γ -Kristalline bekannt: A, B, C, D, E, F, N und S (National Center for Biotechnology Information, ncbi.com). Mutationen im γ D-Kristallin (*CryD*) führen häufig zu kongenitalen Katarakten (Nandrot et al., 2003; Shentu et al., 2004).

Schäden in den Linsenfaserzellen können nur geringfügig repariert werden, da beim Differenzierungsprozess der Zellkern und die Organellen abgebaut werden (Bassnett et al., 2011). Daher kann es im Verlauf des Lebens zu einer Akkumulation von Schäden und damit zur Trübung der Linse im Alter kommen, was als Alterskatarakt bezeichnet wird (Chylack, 1984). Diese wird im nachstehenden Kapitel 1.4.1 genauer erklärt. Neben der natürlichen Alterskatarakt gibt es auch weitere Faktoren, die zur Trübung der Linse führen können: Ionisierende Strahlung (in Kapitel 1.4.2 erläutert), Diabetes, Stoffwechselstörungen, genetische Veranlagungen, Rauchen, Ernährung, Verletzungen/Entzündungen des Auges oder Medikamente (v.a. Kortison) (Brian & Taylor, 2001).

Einleitung

1.4.1 Altersabhängige Katarakte

Altersabhängige Katarakte (*Cataracta senilis*) treten am häufigsten zwischen dem 60. und dem 70. Lebensjahr auf und zeigen eine fortschreitende Trübung der Linse (Asbell et al., 2005). Typische Symptome sind Sehverlust, Blendeempfindlichkeit und Verlust der Kontrastschärfe (Lee et al., 2005). Je nach Lokalisation in der Linse werden Katarakte unterschiedlich bezeichnet (Brown & Bron, 1996). Kerntrübungen in der Linsenmitte sind nukleäre Katarakte. Befindet sich die Trübung im seitlichen Bereich der Linse, wird sie kortikale Katarakt genannt. Trübungen im vorderen Linsenbereich heißen anterior subkapsuläre Katarakt, da sie sich unmittelbar unter der Linsenkapsel befinden. Posterior subkapsuläre Katarakte sind hingegen im hinteren Bereich der Linse angesiedelt.

Besonders schnell fortschreitend sind posterior subkapsuläre Katarakte (PSCs), die mit Vakuolen und Proteineinschlüssen einhergehen (Eshaghian & Streeten, 1980). Nukleäre Katarakte können auch schnell voranschreiten, allerdings entwickeln sie sich meistens langsamer und können auch in der Entwicklung stoppen (Spector et al., 2001). Rückläufig sind Katarakte jedoch nie, sie können aber mit dem Entfernen der Linse und dem Einsetzen einer künstlichen Linse gut behandelt werden (Olsen et al., 2003). Auslöser sind häufig veränderte Stoffwechselprozesse, Strahlung, ultraviolettes Licht oder oxidativer Stress, die Schäden über Jahre akkumulieren und letztendlich zum Alterskatarakt führen (Weikel et al., 2014; Taylor et al., 1988; Brennan et al., 2012; Shiels und Hejtmancik, 2016; Truscott und Friedrich, 2016). Aber auch weitere Faktoren wie Störungen bei Zellen im direkten Umfeld, die für die Versorgung der Linse verantwortlich sind, können zu Trübungen führen (Costello et al., 2012). Da die Entstehung multifaktoriell ist und von der Umwelt beeinflusst wird, wird ein genetischer Anteil von etwa 35-58 % bei der Entstehung von Alterskatarakten angenommen (McCarty und Taylor, 2001). Mögliche Kandidatengene, in denen Mutationen zur Alterkatarakt führen können, sind vor allem *GALK-1* (Galaktokinase-1) und *EPHA2* (Ephrin-Rezeptor A2) (Okano et al., 2001; Shiels et al., 2008). Aber auch Sequenzvariationen im alphaA-Kristallin Gen (*CRYAA*), zeigen einen Zusammenhang mit altersabhängigen kortikalen Katarakten (Bhagyalaxmi et al., 2009, 2010; Liao et al., 2014). Außerdem werden einige Mutationen in DNA-Reparaturgenen mit der Alterskatarakt assoziiert: *WRN* (Werner Syndrom ATP-abhängige Helikase), *XPD* (Xeroderma Pigmentosum), *XRCC1* (Röntgenreparatur-Kreuz komplementierendes Protein 1), *HSF4* (Hitzeschockprotein 4) und *KCL1* (Kinesin leichte Kette 1) (Jiang et al., 2013a, 2013b; Padma et al., 2011; Su et al., 2013).

1.4.2 Strahleninduzierte Katarakte

Nach der Erfindung der Röntgenstrahlung 1895 und dem Einsatz in der Forschung, konnte bereits 1951 ein klarer Zusammenhang von Strahlung und Katarakten gezeigt werden (Cogan et al., 1951). Besonderes Interesse fiel auf diesen Zusammenhang bei Studien der Atombomben-Überlebenden aus Japan, wo eine hohe Prävalenz von Katarakten auftrat (Miller et al., 1967; Minamoto et al., 2004). Dies förderte die tierexperimentelle Forschung, sodass die Auswirkungen von Strahlung auf die Linse genauer dokumentiert werden konnten (Ham, 1953; Merriam & Focht, 1957; Merriam & Focht, 1962). Es konnten zwar verschiedene Typen von Katarakten identifiziert werden, jedoch kamen posterior subkapsuläre Katarakte (PSC) besonders häufig vor und wurden damit als typischer Strahlenkatarakt bezeichnet (Kimura & Ikui, 1953; Christenberry & Furth, 1951).

Merriam und Focht veröffentlichten 1962 einen Bericht über die Entstehung und Klassifizierung von PSCs. Dort wurde beschrieben, dass nach Strahleneinwirkung zunächst am posterioren Ende der Linse kleine Vakuolen und Trübungen entstehen (Stadium 1+), die sich dann auf die anteriore Seite ausbreiten (Stadium 2+) und sich schließlich über die Linse verteilen (Stadium 3+), bis es zur vollständigen Trübung (Stadium 4+) kommt (siehe Abb. 2). Diese Arbeit ist auch heute noch grundlegend für das Verständnis der Entstehung von Strahlenkatarakten.

Epidemiologische Daten zeigten aber, dass bereits geringe Dosen zu Katarakten führen können. Daher wurde der Schwerpunkt der aktuellen Forschung auf die niedrigen Dosen zur Kataraktentstehung gelegt. Obwohl angenommen wird, dass der Schaden durch die Strahlung in den Linsenepithelzellen auftritt, ist der genaue Mechanismus noch nicht verstanden (Ainsbury et al., 2018). Es gibt verschiedene Theorien darüber wie sich der Schaden auswirkt und durch strukturelle Änderungen in den Linsenzellen letztendlich zur Kataraktentstehung beiträgt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Strahlung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen und diese dann die DNA schädigen, sodass oxidierte DNA mittels 8-OHG angezeigt werden kann (Wolf et al., 2008). Die oxidierte DNA trägt zur Progression von Katarakten bei. Außerdem konnte gezeigt werden, dass DNA-Doppelstrangbrüche nach 72 h persistieren und ebenso zur Kataraktentstehung beitragen. Genauso wie das Reparaturprotein XRCC1 (Röntgenreparatur-Kreuzkomplementierendes Protein 1), durch dessen Anwesenheit DNA-Schäden aufgezeigt werden können (Caldecott, 2003).

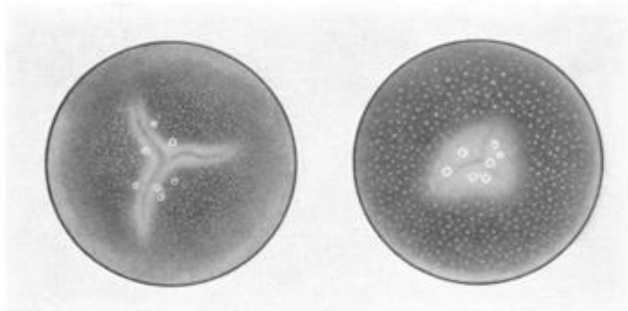


FIGURE 3

Two characteristic 1+ cataracts showing the early central posterior subcapsular vacuoles and dots with widening of the suture lines and an increase in the light reflex.

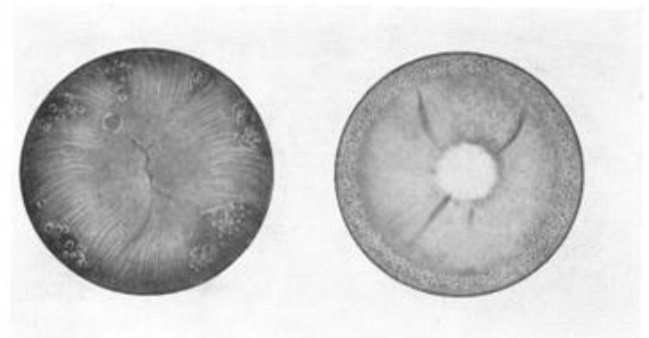


FIGURE 5

A stage 3+ opacity with extension of the changes in both the anterior and posterior cortex. The anterior cortical changes are on the left and the posterior cortical opacities are on the right.

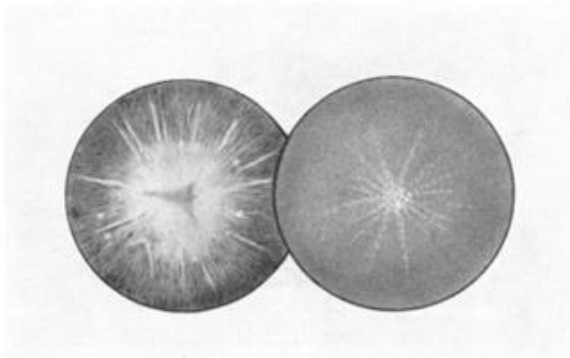


FIGURE 4

A 2+ cataract showing the increase in the posterior cortical opacity, left, and the beginning of the central anterior subcapsular opacity, right.

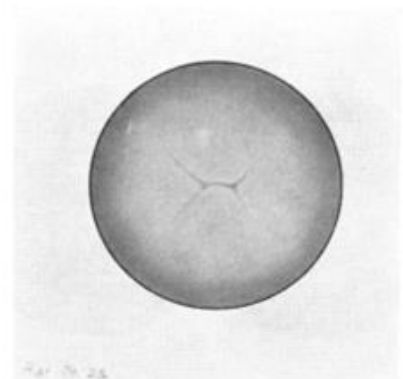


FIGURE 6

A stage 4+ cataract in which the lens is completely opaque.

Abbildung 2: Die Progression von einer posterior subkapsulären Katarakt zu einer vollständig trüben Linse (Bilder 3-6 aus Merriam & Focht, 1962)

1.5 Das Gen *Ercc2*

Das *Ercc2*-Gen oder auch *XPD*-Gen, kodiert das Protein XPD, welches Teil des Transkriptionsfaktor IIH – Komplexes (TFIIH-Komplex) ist (van de Ven et al., 2012). Da es aber auch eine Funktion als Helikase hat, ist es bei der DNA-Reparatur (Abdulrahman et al., 2013) als NER-Protein (Nukleotidexzisionsreparatur) aktiv (Weber et al., 1990). Dort ist *Ercc2*/XPD als Teil des TFIIH-Komplexes aktiv und hilft beim Entwinden der DNA, sodass XPG (ERCC3) und XPF-ERCC1 den DNA-Schaden austauschen können und die Stränge mit Hilfe der DNA-Ligase I wieder verbunden werden können (Christmann et al., 2003).

Einleitung

Wie wichtig die Reparaturfunktion von *Ercc2* ist, zeigt sich, wenn Mutationen in dem Gen auftreten und die Zellschäden, die durch Umwelteinflüsse wie UV-Licht, Chemikalien, freie Radikale und ionisierende Strahlung entstehen können, nicht mehr repariert werden können (Takayama et al., 1996). Beim Menschen sind drei Erkrankungen, bei denen eine *XPD*-Mutation vorliegt, bekannt: Xeroderma pigmentosum (*XPD*), Trichothiodystrophy (*TTD*) und Cockayne Syndrome (*CS*) (van den Ven et al., 2012). *XPD* ist durch eine besondere Lichtempfindlichkeit charakterisiert, wodurch es schon im Kindesalter zu Hautkarzinomen kommen kann. Außerdem sind Glaukome berichtet, sowie neurologische Auffälligkeiten (Cleaver, 1968; Kraemer et al., 1987). *TTD* kennzeichnet sich durch kurze, brüchige Haare, einen Defekt von hoch-Schwefel Matrixproteinen und neuroektodermale Störungen (Itin et al., 2001). *CS* zeigt neben der Lichtempfindlichkeit ein heterogenes Krankheitsbild auf, mit Wachstumsstörungen, neurologische Auffälligkeiten, Karies, Hörverlust, pigmentäre Retinopathie und Katarakte (Nance & Berry, 1992; Troelstra et al., 1992).

Eine Radiotoxizität aufgrund von *XPD*-Mutationen wurde berichtet, besonders der Polymorphismus von DNA-Reparaturgenen führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung durch Strahlung (Rzeszowska-Wolny et al., 2005; Shkarupa et al., 2015; Song et al., 2015).

1.6 Die Mausmutante *Ercc2* / *RCO015*

Die Mausmutante *Ercc2* (auch *RCO015*) wurde durch einen ENU-Mutagenese-Screen (Helmut Fuchs, IEG, Helmholtz Zentrum München) entdeckt. Mittels Exom-Sequenzierung wurde auf dem Chromosom 7 im Abschnitt 116J6.1 - D7Mit294 das Gen *Ercc2* mit einer Punktmutation T -> C identifiziert. Diese Punktmutation führt im Exon 23 (C-Terminus) zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Prolin (Ser737Pro). Der Phänotyp ist nur bei homozygoten Tieren zu beobachten und zeichnet sich durch die Entwicklung einer kortikalen Katarakt 3 Wochen nach der Geburt aus, kleine Augen, sowie eine geringere Gesamtkörpergröße und raues Fell. Homozygote Weibchen sind steril. Bei heterozygoten *Ercc2*-Mutanten ist kein Phänotyp zu beobachten, außer einem leicht vergrößerten Habitus (vgl. Abb. 3).

Einleitung

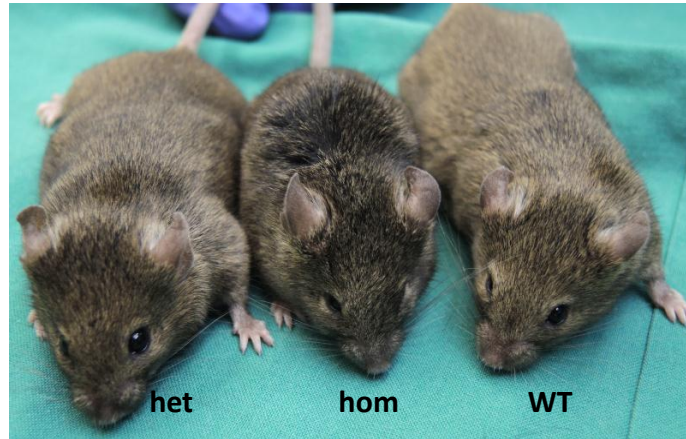


Abbildung 3: Vergleich der homozygoten *Ercc2*-Mutante (*hom*) mit der heterozygoten *Ercc2*-Mutante (*het*) und dem Wildtyp (*WT*) im Alter von 9 Monaten.

Das Protein ERCC2 ist ab P7 nahezu in der gesamten Linse exprimiert (Kunze et al., 2015). Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen den Genotypen. Die ausgeprägte Expression bestärkt die Bedeutung bei Reparaturprozessen in der Linse. Dies erklärt vermutlich auch warum der Aminosäureaustausch Ser737Pro bei der homozygoten Mutante einen enormen Einfluss auf die Linse hat, sodass sich schon ab P21 Katarakte ausbilden.

Die Lymphozyten heterozygoter Mutanten sind im Vergleich zum Wildtyp strahlenempfindlicher (Kunze et al., 2015). Aufgrund der höheren Anzahl von persistierenden DNA-Doppelstrangbrüchen bei den Proben der heterozygoten Mutante, ist dies ein Hinweis auf eine höhere Suszeptibilität der Mutante in Bezug auf Strahlung. Daher wurde die heterozygote *Ercc2*^{+/-} Mutante für die Lifetime Studie eingesetzt, um diese genetische Komponente im Vergleich zum Wildtyp in Bezug auf ionisierende Strahlung zu testen (vgl. Dalke et al., 2018). Es wurde angenommen, dass die geschwächte Reparaturkapazität in der Linse der heterozygoten Mutanten in Verbindung mit ionisierender Strahlung zur Kataraktentstehung beiträgt. Den Erwartungen zufolge sollten bereits geringe Dosen wie 0,063 Gy oder 0,125 Gy zu Katarakten führen, insbesondere im Vergleich zum Wildtyp.

2. Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Bestell-Nr.	Hersteller
Absolute/DQ™p150 Kit (96) AB Sciex (Testkit für Metabolomics)	-	Biocrates Life Science, Innsbruck, Österreich
Absolute/DQ™ p150 to p180 Kit (Testkit für Metabolomics)	-	Biocrates Life Science, Innsbruck, Österreich
Accutase	A11105-01	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Agarose	840004	Biozym Scientific, Oldendorf
“Anti-Anti” Antibiotic- Antimycotic (100x)	15240-096	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Aqua Poly/Mount	18606	Polysciences, Eppelheim
BSA 10 %-Lösung	A1595	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA Pulver	A7906-50G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure, ≥ 99,8%, p.a.	6943.1	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	1818.1	Roth, Karlsruhe
Crystal-violet 1 % -Lösung	V5265-250ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	D9564	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS (Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline)	14190-094	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Eisessig	1.00063.2500	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	202821.330	VWR Chemicals, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III) ≥ 99%, p.a., ACS	8043.2	Roth, Karlsruhe
Eukitt	03989	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd (37 %)	533998-500ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fibroblast Growth Factor-2	SRP4038	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS	10270-106	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Fuchsin, basisch	00635	Polysciences, Eppelheim
Glycin ≥99%, p.a.	3908.2	Roth, Karlsruhe
Medium 199	22340-020	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Medium 199 w/o Phenolrot	11043-023	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Methylenblau-Chlorid	04220	Polysciences, Eppelheim
MilliQ	-	Reinstwasser

Materialien

Mono-Natriumcitrat ≥ 99%, reinst, wasserfrei	HN13.3	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	033.6	Roth, Karlsruhe
Roti-Histol	6640	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (32 %)	X.896.1	Roth, Karlsruhe
Technovit 8100 (Kaltpolymerisierender Kunststoff für Immunhistochemie)	010157	Heraeus Kulzer GmbH Division Technique, Wehrheim
Trinatriumcitrat-Dihydrat	3580.1	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan) ≥ 99%, Ph.Eur., USP	A411.2	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin 0,25 %	252000-056	Gibco by Life Technologies, Darmstadt
Trypanblau	L6323	Biochrom AG, Berlin
VE-Wasser (vollentsalztes Wasser)	-	deionisiertes Wasser
Wasserstoffperoxid 30 %- Lösung	8070.1	Roth, Karlsruhe

2.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
Basisches Fuchsin Stammlösung	0,13 % (w/v) basisches Fuchsin in VE-Wasser
Blockierlösung (für IHC)	1 % BSA (w/v) 0,3 % Triton-X 100 (v/v) in PBS
Citratpuffer (0,1 M)	18 ml Stock A (4,2 g Citronensäuremonohydrat ad 200 ml VE-Wasser) 82 ml Stock B (14,7 g Trinatriumcitrat-Dihydrat ad 500 ml VE-Wasser) 900 ml VE-Wasser
Davidson-Fixierlösung	90 ml Ethanol 60 ml Formaldehyd (37%) 30 ml Eisessig 90 ml VE-Wasser
Färbelösung Methyleneblau-	36 ml Methyleneblau-Stammlösung (0,13%)

Materialien

basisch-Fuchsin	48 ml Basisches-Fuchsin-Stammlösung (0,13%) 60 ml PBS (0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,6) 36 ml 95 % Ethanol
Methylenblau Stammlösung	0,13 % (w/v) Methylenblau in VE-Wasser
TBE	89 mM TRIS 89 mM Borsäure 2 mM EDTA in H ₂ O pH 8,0
10x TBS (Stammlösung)	8 % NaCl 0,2 % KCl 25 % TRIS/HCl (pH 7,5) in H ₂ O
TRIS (1 M, pH 8)	121,14 g TRIS in 1 L VE-Wasser pH 8,0
PBS	8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,27 g Kaliumphosphat ad 1 l MilliQ, pH 7,4
Peroxidase-Blockierlösung	15 ml 32 % H ₂ O ₂ ad 200 ml PBS
Proteinase K Puffer	2 % TRIS/HCl (pH 7) 0,2 % EDTA (0,5 M) In VE-Wasser
Suspensionsmedium	500 ml Medium 199 w/o Phenolrot + 5 ml "Anti-Anti" Antibiotic-Antimycotic (100x)
Zellkulturmedium für die Organkultur	500 ml Medium 199 w/o Phenolrot + 5 ml 10 % BSA + 5 ml "Anti-Anti" Antibiotic-Antimycotic (100x) + 500 µl FGF-2 (100 ng/ml) + 25 ml FBS

2.3 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Antikörper gegen	Verdünnung	Spezies	Firma	Bestellnr.	Probe
8OHG	1:200	goat	Linaris (Alpha Diagnostics), Dottenheim	8OHG12-S	Augenschnitte
53BP1	1:300	rabbit	Novus Biologicals, Wiesbaden	NB100-305	Linsenorgankultur
cleaved Caspase-3	1:100	rabbit	Cell Signalling, Frankfurt a.M.	9661S	Linsenorgankultur
DNaseIIβ	1:50-1:100	goat	Santa-Cruz Biotech., Heidelberg	sc131923	Augenschnitte
Ki67	1:150	rabbit	Abcam, Cambridge UK	ab15580	Augenschnitte
PCNA	1:200	mouse	Abcam, Cambridge UK	ab29	Augenschnitte
γ-H2AX	1:300	rabbit	NEB (CellSignalling), Frankfurt a.M.	97189	Augenschnitte, Linsenorgankultur
γ-H2AX	1:400	mouse	MerckMillipore, Darmstadt	05-636	Augenschnitte, Linsenorgankultur

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezies	Firma	Bestellnr.
Alexa488	1:250	Donkey anti-rabbit	Life Technologies, Darmstadt	A-21206
Alexa488	1:250	Donkey anti-goat	Life Technologies, Darmstadt	A-11055
Alexa488	1:250	Donkey anti-mouse	Life Technologies, Darmstadt	A-21202
Cy3	1:250	Donkey anti-goat	Dianova, Hamburg	705-165-147
Cy3	1:250	Goat anti-mouse	Life Technologies, Darmstadt	A10521

Materialien

Cy3	1:250	Anti-rat	Jackson/Dianova, Hamburg	712-163-153
Cy3	1:250	Anti-sheep	Jackson/Dianova, Hamburg	713-165-003
Cy5	1:250	Anti-rabbit	Jackson/Dianova, Hamburg	111-175-003

2.4 Geräte

Agilent 1200 Serien HPLC	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
API 4000 System	AB Sciex Deutschland GmbH, Darmstadt
Binokular WILD MZ8	Leica, Wetzlar
Eldorado 78 Teletherapy irradiator (Bestrahlungsanlage)	AECL, Chalk River, Kanada
Eppendorf Zentrifuge 5415R, Rotor 85503	Eppendorf, Hamburg
FIY 1200 Series	Agilent Technologies, Waldbronn
Hamilton Microlab STAR™ Arbeitsstation	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Heizplatte OTS40	Medite Medizintechnik, Burgdorf
HTC PAL auto sampler	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Kühlmikrotom HM 340E	Thermo Fisher Scientific, Barunschweig
Kühlzentrifuge Sigma 3K18	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Laborwaage EMB2000-2	Kern, Balingen
Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Evos Fl Auto	Life Technologies, Darmstadt
Mikroskop Keyence Biorevo BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikroskop Labovert	Leica, München
Mikroskop Olympus 8934	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus IX83	Olympus, Hamburg
PCR-Cycler LifeEco	Bioer, Hangzhou, China

Materialien

pH-Meter Seven easy	Mettler Toledo, Gießen
Rotationsmikrotom Jung RM2055	Leica, Wetzlar
Spectrophotometer ND-1000	peqLab, Erlangen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultramikrotom OmU3	Reichert, Wien, Österreich
Ultravap Stickstoff Evaporator	Porvair Sciences, Wrexham, UK
Zellkulturinkubator BB6060	Heraeus, Wehrheim
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen

2.5 Verbrauchsmaterialien

48 Well Platte (353230)	Falcon via Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
C-Chip Zählkammern (DHC-NO1)	Kisker Biotech, Steinfurt
Einbettkapseln BEEM Embedding Capsules Size 3 (00336-100)	Science Services GmbH, München (Original Polysciences, Warrington, USA)
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost Plus (J1800AMNZ)	Thermo Scientific, Braunschweig
Parafilm (PM-999)	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Peqlab Tubes	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
quadriPerm Schalen (94.6077.308)	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Dish Zellkulturpetrischalen 60x15	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Zellkulturinkubator BB6060	Heraeus, Wehrheim
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen

2.6 Software

Histologie:

Aufnahme: Mikroskop Axioplan mit zugehöriger Software AxioVision 4.8.1, beides von Zeiss

Bildbearbeitung: GIMP 2.8 (2012-05-03) oder 2.10.8 (2018-11-08), Quelle: www.gimp.org

Stochastik mit SAS 9.4 (SAS Institut, Cary, NC, USA)

Immunhistochemie:

Bildbearbeitung: ImageJ 1.52, Quelle: www.imagej.nih.gov

Metabolomics:

Datenanalyse: R Version 3.4.4

Metaboanalyst4.0 (metaboanalyst.ca)

2.7 Mauslinien

Die verwendeten Mäuse stammen aus eigener Zucht im Tierstall des Helmholtz Zentrums München.

Für die Organentnahme wurden Tiere im Alter von circa 10 Wochen verwendet.

Wildtyp (WT) Mäuse

(C57BL/6JG x C3HeB/FeJ) - F1 sind Wildtyp-Maushybriden der Filialgeneration F1, die aus einer Verpaarung weiblicher Wildtyp-Mäuse C57BL/6JG (MGI: 6198736) und männlicher Wildtyp-Mäuse C3HeB/FeJ (MGI: 2159873) hervorgegangen sind.

Heterozygote *Ercc2*^{+/-} Mäuse

(C57BL/6JG x *Ercc2*^{-/-}) - F1 sind heterozygote *Ercc2*^{+/-} Mausmutanten, die aus einer Verpaarung weiblicher Wildtyp-Mäuse C57BL/6JG (MGI: 6198736) und männlicher homozygoter *Ercc2*^{-/-} Mausmutanten auf C3HeB/FeJ Stammhintergrund (MGI: 5621284) hervorgegangen sind.

Dieses Verpaarungsschema wurde gewählt, da die *Ercc2*^{-/-} Mutanten (Kunze et al., 2015) nur auf

Materialien

C3HeB/FeJ Stammhintergrund verfügbar waren. Allerdings weist der C3H-Mausstamm eine rezessive Mutation des *Pde6b^{rd1}* Gens auf, die bei homozygotem Auftreten zu einer retinalen Degeneration führt. Durch die Verpaarung mit einem Mausstamm, der diese Mutation nicht trägt, sind alle Nachkommen heterozygot für dieses Gen und entwickeln keine Retinadegeneration. Ebenso verhält es sich bei der rezessiven *Ercc2* Mutation, und alle F1-Hybriden sind phänotypisch nicht auffällig. Die Paarungen für die F1-Hybride wurden immer mit weiblichen C57BL/6JG Mäusen durchgeführt, weil homozygote *Ercc2^{-/-}* Weibchen aufgrund der Mutation steril sind (Kunze et al., 2015).

2.8 Kunststoff-eingebettete Augen aus der Lifetime-Studie

Aus den verschiedenen Bestrahlungsgruppen der Lifetime-Studie (Dalke et al., 2018) wurden jeweils 3 Augen (nur die rechten Augen verschiedener Mäuse) pro Dosis (0; 0,063; 0,125; 0,5 Gy), Geschlecht (Männchen, Weibchen) und Genotyp (Wildtyp, Mutante) für weitere Untersuchungen in Kunststoff (Technovit 8100) eingebettet. Diese wurden von Dr. Dalke für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine genaue Übersicht der verwendeten Tiere mit zugehörigen Identifikationsnummern (ID) befindet sich im Anhang (Tabellen 12-15). Diese Tiere stammen aus dem Tierversuchsantrag mit der Nummer 55.2-1-54-2532-161-2012.

3. Methoden

3.1 Histologie und Immunhistochemie von Augen

3.1.1 Fixierung und Einbettung von Augen in Plastik und Anfertigung von Schnitten

Nach dem jeweiligen Versuchsende wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und die Organe der Tiere aus der Lebenszeit-Studie (Dalke et al., 2018) wurden zeitnah präpariert. Die Augen wurden mit einer Pinzette aus der Augenhöhle entnommen und umgehend in Davidson-Lösung zum Fixieren überführt. Nach 3-4 Tagen wurden die Augen 3 x 15 min mit Ethanol absolut gewaschen und anschließend über Nacht in Infiltrationslösung (nach Herstellerangaben für Technovit 8100) inkubiert. Frische Polymerisationslösung (nach Herstellerangaben für Technovit 8100) wurde angemischt und die Augen wurden einzeln in kleinen zylinderförmigen Einbettkapseln eingebettet. Am nächsten Tag wurden die Blöcke aus den Einbettkapseln herausgelöst und bis zum Schneiden bei 4 °C aufbewahrt. Diese wurden, ausgenommen von den 6 Monats-Tieren, im Rahmen der Lebenszeit-Studie gesammelt und von Dr. Dalke zur Verfügung gestellt.

Die in Kunststoff eingebetteten Augen wurden am Ultramikrotom mit Glasmessern in einer Schnittdicke von 2 µm geschnitten. Die Schnitte aus dem Bereich des Sehnervs wurden mit einer Pinzette auf Wassertropfen auf Objektträgern transferiert und getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C zum vollständigen Trocknen aufbewahrt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4°C in einem geschlossenen Behältnis.

3.1.2 Übersichtsfärbung mit Methylenblau-basisches Fuchsin

Für die histologische Analyse wurden die Plastik-Schnitte mit Methylenblau und basischem Fuchsin gefärbt. Diese Übersichtsfärbung mit Methylenblau-basisch-Fuchsin entspricht in der Farbverteilung der Hämatoxilin-färbung auf Paraffinschnitten (Böck, 1984).

Für die Färbung wurden vier Küvetten vorbereitet: eine Küvette zum Anfeuchten der Schnitte mit VE-Wasser, eine Küvette zum Färben und zwei mit VE-Wasser zum Entfärben. Die Schnitte wurden nach dem Anfeuchten in VE-Wasser 25 s in die Färbelösung gegeben und zweimal ausgewaschen. Anschließend wurden die Objektträger gut getrocknet, bevor sie mit Eukitt eingedeckt wurden. Die histologische Untersuchung erfolgte an einem Axioplan-Mikroskop mit der zugehörigen Software AxioVision. Es wurden jeweils 2,5x Vergrößerungen zur Übersicht des gesamten Auges und 20x

Methoden

Vergrößerungen für Detailansichten (anterioren Linsenbereich, Linsenbogen, Linsenmitte und posteriorer Linsenbereich) fotografiert. Die Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware GIMP (2.8 (2012-05-03) oder 2.10.8 (2018-11-08)) bearbeitet. Es wurde ein Punkt zum Weißabgleich gewählt und die Helligkeit sowie der Kontrast reguliert.

Zunächst wurden die Bilder histologisch ausgewertet und in zuvor festgelegte Kategorien eingeordnet. Diese sind:

- Anterior: vergrößerte/geschwollene Faserzellen, Ablösungen, kleine Vakuolen, Risse, delokalisierte Zellkerne und anterior subkapsuläre Katarakte
- im Linsenbogen: vergrößerte/geschwollene Faserzellen, kleine Vakuolen, Risse und delokalisierte Zellkerne
- Posterior: vergrößerte/geschwollene Faserzellen, kleine Vakuolen, Risse, delokalisierte Zellkerne und posterior subkapsuläre Katarakte.

3.1.3 Statistische Auswertung der Histologie

Die statistische Auswertung erfolgte über die Core-Facility des Instituts für computerbasierte Biologie (ICB). Durchgeführt wurden die statistischen Analysen von Herrn Dr. Beyerlein. Dafür wurden zunächst die Kategorien in Tabellen aufbereitet und die Häufigkeit der auftretenden Phänomene bestimmt. Das Chancenverhältnis (OR) wurde mit zugehörigem 95 % Konfidenzintervall (CI) berechnet und für die einzelnen Kategorien bestimmt. Dies wurde mit der Firth's Schätzer im Logistischen Regressionsmodell berechnet, wobei die Strahlung (0 Gy als Referenz), Alter (4 h nach der Bestrahlung als Referenz), Geschlecht und Genotyp als Vorgaben für mögliche Ergebnisse gewählt und jeweils gegenseitig füreinander angepasst wurden. Das Signifikanzlevel wurde auf 5 % gesetzt, ohne für multiples Testen zu korrigieren, da es sich um eine explorative Studie handelt.

3.1.4 Immunhistochemische Färbungen von Plastik-Schnitten

Für die verschiedenen Antikörperfärbungen auf Plastik-Schnitten wurden unterschiedliche Protokolle verwendet, die zur Übersicht in Tabelle 1 aufgeführt sind. Dies war notwendig, weil der genutzte Antikörper gegen 8-OHG DNA, RNA und Proteine anfärben kann, was durch die Behandlung der Proben mit Salzsäure auf DNA und RNA reduziert werden konnte (beschrieben in Wolf et al., 2008). Somit ergab sich ein abweichendes Protokoll zur bewährten Methode mit Peroxidase und Proteinase K Behandlung, welche für die Antikörper gegen DNaseII β und Ki67 verwendet wurde. Die Schnitte wurden zunächst 2 x 10 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte je nach Antikörper (siehe

Methoden

Tabelle 1) entweder das Blockieren 30 min mit Peroxidase (3 % H₂O₂ in PBS) und eine 2-minütige Behandlung mit Proteinase K (1 µg/ml in Proteinase K Puffer) oder eine Salzsäurebehandlung (2N HCl) für 5 min mit anschließender Neutralisation für 5 min in TRIS (1 M, pH 8). Danach wurden die Schnitte nochmals 2 x 10 min in PBS gewaschen. Zur Wiederherstellung der Epitope wurden die Schnitte 25 min in Citrat-Puffer in einem Dampfdrucktopf in einer Mikrowelle bei 600 W gekocht. Der verschlossene Topf wurde für 30 min bei RT zum Abkühlen ruhen gelassen. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 x 10 min in PBS gewaschen. Das Blockieren der unspezifischen Epitope erfolgte für 1 h mit Blockierlösung bei RT. Dann wurden die Schnitte mit entsprechenden Verdünnungen der Antikörper in einer Feuchte-Kammer über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am zweiten Tag wurde aufgrund der lichtempfindlichen Sekundärantikörper bei Gelblicht gearbeitet. Zunächst wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde der zu dem Primärantikörper entsprechende Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 auf die Schnitte gegeben und für 90 min in einer Feuchte-Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut 3 x 5 min in PBS gewaschen, bevor sie für 15 min mit DAPI (1:10.000) gegengefärbt wurden. Darauf folgte erneut 3 x 5 min in PBS waschen und 1 x 1 min in MilliQ. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in Aqua Poly/Mount eingedeckt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 1: Färbeprotokoll verwendeter Antikörper für Färbungen auf Plastik-Schnitten

Antikörper	Peroxidase-Blocking	ProteinaseK-Behandlung	HCl-Behandlung	Neutralisation (TRIS pH 8)
8-OHG				x
DNaseIIβ		x		
Ki67		x		

3.2 Linsenorgankultur

3.2.1 Präparation von Linsen

Es wurden jeweils von männlichen und weiblichen Tieren und von beiden Genotypen (Wildtyp und *Ercc2*^{+/-} Mutante) Augen entnommen und für die Linsenorgankultur vorbereitet. Um eine ausreichende Anzahl an Linsen zu bekommen, wurden von jeweils zwei bis vier Tieren die Augen entnommen.

Bei der Linsen-Präparation für die Organkultur ist es wichtig, dass die Augen nicht abkühlen, um die

Methoden

Linsen intakt zu halten. Deshalb wurden sie rasch nach dem Tod der Tiere (mit CO₂) entnommen und alle verwendeten Lösungen auf 37°C vortemperiert. Die entnommenen Augen wurden sofort in warmem DPBS gewaschen und bis zur Präparation in warmes Suspensionsmedium gegeben. Die Augen wurden anterior durch die Hornhaut mit drei Schnitten geöffnet, sodass die Linse leicht entnommen werden konnte. Die Linsen wurden vom Ziliarkörper und anderen adhärennten Bestandteilen gesäubert, wobei darauf zu achten war, dass die Linsenkapsel nicht beschädigt wurde. Anschließend wurden sie einzeln in 48-Well Platten mit Medium (Medium 199 w/o Phenolrot, „Anti-Anti“, FBS, BSA und FGF-2) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden trübe oder beschädigte Linsen aussortiert, um nur intakte Linsenorgankulturen in Bestrahlungsversuche einzubringen.

3.2.2 Bestrahlung von Linsen

Bei den intakten, klaren Linsen wurde vor der Bestrahlung das Medium (3.2.1) gewechselt. Die 48-Well Platten wurden vor und nach dem Bestrahlen in einer warmen Styroporbox aufbewahrt und schnellstmöglich wieder in den Inkubator gestellt.

Die Bestrahlung erfolgte mit der Cobalt-60-Quelle des Eldorado Teletherapie 78 Bestrahlungsgeräts mit einer Dosisrate von 63 mGy/min. Die Linsen wurden entweder mit 0.5 oder 1 Gy bestrahlt. Kontrollen wurden gleich behandelt und mit 0 Gy scheinbestrahlt. Nach 1, 4 oder 24 h wurden die Linsen 2 h in Davidson-Lösung fixiert. Anschließend wurden sie für 3 x 15 min in Ethanol absolut gegeben, um sie für die Einbettung in Paraffin vorzubereiten (die Entwässerung erfolgte maschinell mit dem Tissue-Tek VIP™ 5 von Sakura).

3.2.3 Einbettung und Schneiden von Linsen in Paraffin

Nach der Entwässerung wurden die Linsen in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Linsen so orientiert, dass am Mikrotom Sagittalschnitte angefertigt werden konnten, was bedeutet, dass die Linse auf der Äquatorialebene seitlich liegend orientiert wurde (siehe Abb. 4). Dadurch konnte beim Schneiden von 2 µm Schnitten eine Orientierung der Linse gewährleistet werden, die apikal das anterior liegende Linsenepithel zeigte, distal den posterioren Linsenbereich und lateral den Linsenbogen. Die Paraffin-Schnitte wurden dann auf Objektträger transferiert und getrocknet. Bis zur Verwendung wurden sie bei -20°C in geschlossenen Behältern gelagert.

Methoden

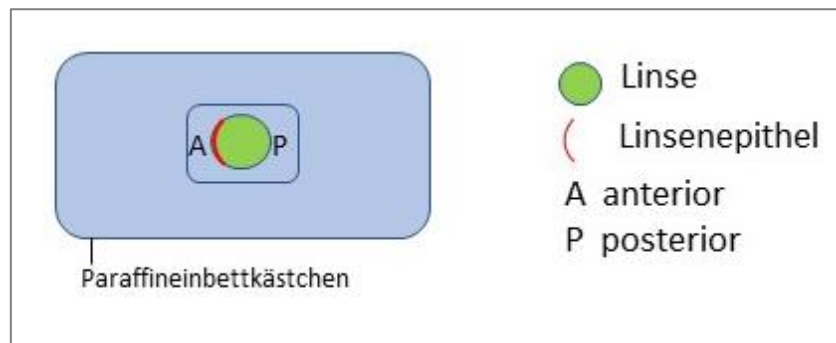


Abbildung 4: Schematische Darstellung vom Einbetten der Linsen in Paraffin

3.2.4 Färbung von Paraffin-Schnitten

Um die Schnitte für Antikörper zugänglich zu machen, wurde zunächst das Paraffin herausgelöst, wofür die Objektträger 2 x 15 min in Roti-Histol getaucht wurden. Danach erfolgte die Rehydrierung durch 2 x 4 min Waschen in 100 % EtOH und jeweils 1 x 4 min in 95 % EtOH, 80 % EtOH, 60 % EtOH und 30 % EtOH. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 15 min in VE-Wasser hydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 25 min in einem Dampfdrucktopf mit Citratpuffer bei 600 W in einer Mikrowelle gekocht. Die Abkühlzeit betrug 30 min. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 x 10 min in PBS gewaschen. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte für 30 min bei RT in Blockierlösung. Anschließend wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung hinzugegeben und die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchte-Kammer inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper gegengefärbt. Das Protokoll entspricht dem unter 3.1.3 beschriebenen Prozess.

3.2.5 Analyse von Doppelstrangbrüchen

Um die Auswirkungen der Bestrahlung (siehe 3.2.2) auf die DNA der Linsenzellen in Organkultur zu bestimmen, wurden die Schnitte der Linsen zur Sichtbarmachung der Doppelstrangbrüche mit Antikörpern gegen γ H2AX und 53BP1 gefärbt. Damit werden deutliche Hinweise auf Doppelstrangbrüche gegeben (Celeste et al., 2003 und Schultz et al., 2000), wodurch Rückschlüsse auf die von der Strahlung induzierten Schäden zugelassen werden können (Ward, 1990). Durch die Auswertung von Proben von verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, ist es möglich, durch die Bestimmung der Doppelstrangbrüche einen zeitlichen Verlauf der Reparatur zu beobachten (Markova et al., 2007). Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll wie in 3.2.4 beschrieben.

Methoden

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Axiovert 200 M untersucht; die Bilder vom Linsenepithel wurden mit 10facher Vergrößerung fotografiert. Ausgezählt wurden die einzelnen Färbungen (γ H2AX in rot und 53BP1 in grün) in den Zellkernen (DAPI), sowie die colokalisierten (gelben) Foci. Colokalisierten Foci wurden als echte Doppelstrangbrüche gewertet (Ward et al., 2003) und deren Vorkommen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten 1 h, 4 h und 24 h nach Bestrahlung gezählt. Außerdem wurden die verschiedenen Dosen (0; 0,5 und 1 Gy), sowie die beiden Genotypen und die Geschlechter berücksichtigt.

Die statistische Auswertung wurde in Excel mit Hilfe eines t-Tests durchgeführt. Dabei wurde die 2-seitige Verteilung und 2 Stichproben mit gleicher Varianz benutzt (Funktion t.test (Matrix 1; Matrix 2; 2; 2)).

3.2.6 Apoptose-Färbung

Um apoptotische Vorgänge in den Linsen in Kultur nach der Bestrahlung anzuzeigen, wurden einige Schnitte mit einem Antikörper gegen *cleaved Caspase 3* angefärbt (Gown und Willingham, 2002). Die Färbung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben inklusive Gegenfärbung mit DAPI auf Linsenschnitten. Untersucht wurden die Linsen mit einem Axiovert 200 M Mikroskop.

3.3 Metabolomics von bestrahlten Linsen und Plasma

3.3.1 Vorbereitung der Proben und Messung

Die Sammlung der Proben erfolgte im Rahmen der Lifetime Studie (Dalke et al., 2018). Die Untersuchung des Metaboloms von bestrahlten Linsen und Plasma wurde durchgeführt, um Änderungen in den Metabolit-Konzentrationen aufgrund der Bestrahlung und deren Langzeiteffekte aufzuzeigen. Außerdem war von Interesse, ob Änderungen in der Linse ein Korrelat im Plasma finden und umgekehrt. Mit dem Absolute[™]IDQ p180 Kit können bis zu 188 Metabolite quantifiziert werden. Darunter Aminosäuren (21), biogene Amine (21), Zucker (1), Acylcarnitine (40), Lysophosphatidylcholine (14), Phosphatidylcholine (76) und Sphingolipide (15). Eine genaue Auflistung der Metaboliten findet sich im Anhang.

Die Tiere wurden 4 h, 24 h und 12, 18 und 14 Monate nach der Bestrahlung mit 0; 0,063 Gy; 0,125 Gy oder 0,5 Gy mit CO₂ getötet und die Organe wurden umgehend entnommen. Darunter fiel auch die Entnahme von Blut. Das hieraus isolierte Blutplasma wurde in Behältern mit flüssigem Stickstoff

Methoden

eingefroren. Die Augen wurden entnommen und die Linsen präpariert. Diese wurden ebenfalls direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Verwendung bei -80 °C.

Die 96 Tief-Well-Platten (*deep well plates*) wurden mit einem internen Standard, den Kalibratoren (Cal 1-7) und den Qualitätskontrollen (QC 1-3) nach Angaben des Herstellers für das AbsoluteIDQ p180 Kit vorbereitet. 10 µl der Plasmaproben wurden pro Vertiefung (Well), ohne weitere Vorbereitung, aufgetragen. Die Linsenproben benötigten eine andere Vorgehensweise: Zunächst wurde das Gewicht der Linsen ermittelt und die achtfache Äquivalentmenge von Ethanol-Phosphatpuffer (85 % EtOH, 15 % Phosphatpuffer) zugegeben (Gewebefaktor 1+8). Dies wurde mit den Keramikkügelchen der 1 ml Gefäße (Precellis, Peqlab) homogenisiert und zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 10 µl je Vertiefung auf die 96 Tief-Well-Platten aufgetragen. Das weitere Verfahren erfolgte nach der Beschreibung des Herstellers für das AbsoluteIDQ p180 Kit, um die Proben für die Messung vorzubereiten.

Die Messung der Metabolite erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Proben mit dem LC-MS/MS (Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung) bei 50 °C gemessen, im Anschluss daran wurde mit dem FIA-MS/MS (Fließinjektionsanalyse mit Massenspektrometrie-Kopplung) bei 20 °C gemessen. Es erfolgt eine chromatografische Auftrennung mit anschließender Zuordnung der Datenpunkte zum Massenspektrum. Beide Messungen erfolgten vollautomatisch. Eine genaue Beschreibung der Methode für das Blutplasma ist in Zukunft et al. (2013) veröffentlicht. Für die Linsen wurde das Protokoll wie oben beschrieben entwickelt. Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Silke Becker, die auch das Bedienen der Massenspektrometer übernahm.

3.4.2 Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe der Statistik Software R (Version 3.4.4) berechnet und analysiert. Vor der statistischen Analyse wurden die Rohdaten bearbeitet. Bei den Linsen wurden die Metabolitkonzentrationen normalisiert, indem sie mit dem Mittelwert der Kontrollproben (humanes Plasma) multipliziert wurden. Dies wurde für alle Platten durchgeführt. Metaboliten mit einer Koeffizienzvariation von > 25 % wurden ausgeschlossen. Bei 40 % der Proben fielen die Messwerte unter das Detektionslimit, weshalb auch diese Werte nicht berücksichtigt wurden. Diese Werte wurden durch den niedrigsten gemessenen Wert ersetzt, der durch $\sqrt{2}$ geteilt wurde und mit einem zufälligen Faktor zwischen 0,75 und 1,25 multipliziert wurde.

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurde durchgeführt, um

Methoden

mögliche Strahleneffekte aufzudecken. Metaboliten, die hauptsächlich zur Trennung der Gruppen beigetragen haben, wurden mit dem Signalwegfinder des Metaboanalyst 4.0 weiter analysiert. Dazu wurden HMDB (Human Metabolome Database) ID's und die Signalwegbibliothek für *Mus musculus* (SMPDB (the Small Molecule Pathway Database) genutzt. Das Signifikanzlevel wurde auf $p < 0,05$ gesetzt und der Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurde mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Diese spezielle Auswertung wurde von Dr. Alexander Cecil und Dr. Gabriele Möller durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Histologische Untersuchungen der Augen bestrahlter Mäuse in Hinblick auf die Kataraktentstehung

Die histologische Untersuchung der Augen ist wichtig, um die mit Scheimpflug und OCT (*Optical coherence tomography*) beobachteten Veränderungen während der Lebenszeitstudie (Dalke et al., 2018) zu validieren bzw. zu ergänzen. Die Histologie ermöglicht es kleine morphologische Veränderungen zu erfassen und eine detaillierte Analyse der Auswirkungen von Strahlung auf die Augen, insbesondere die Linse, zu geben.

Bei der histologischen Untersuchung der Augen, die 4 h nach der Bestrahlung entnommen wurden, konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben gefunden werden. Es konnten auch keine Unterschiede zwischen den Augen des Wildtyps und der *Erc2^{+/-}* Mutante gefunden werden, (siehe Abbildung 5). Zu diesem frühen Zeitpunkt sind bei den verwendeten Dosen noch keine morphologischen Veränderungen erwartet worden, sodass dieser Zeitpunkt als Normalbefund betrachtet werden konnte.

Die Färbung in Abbildung 5 ist eine Übersichtsfärbung, ähnlich wie die Hämatoxylin-Färbung. Zellkerne werden blau markiert, basische Bestandteile in rosa. Die Linsenmitte ist aufgrund ihrer minderen Fixierung meistens nur leicht bläulich. Diese Vergrößerung wird zur ersten Übersicht verwendet, um grobe Auffälligkeiten, wie etwa Verformungen der Linse oder der Retina, zu erfassen.

4 h nach Bestrahlung

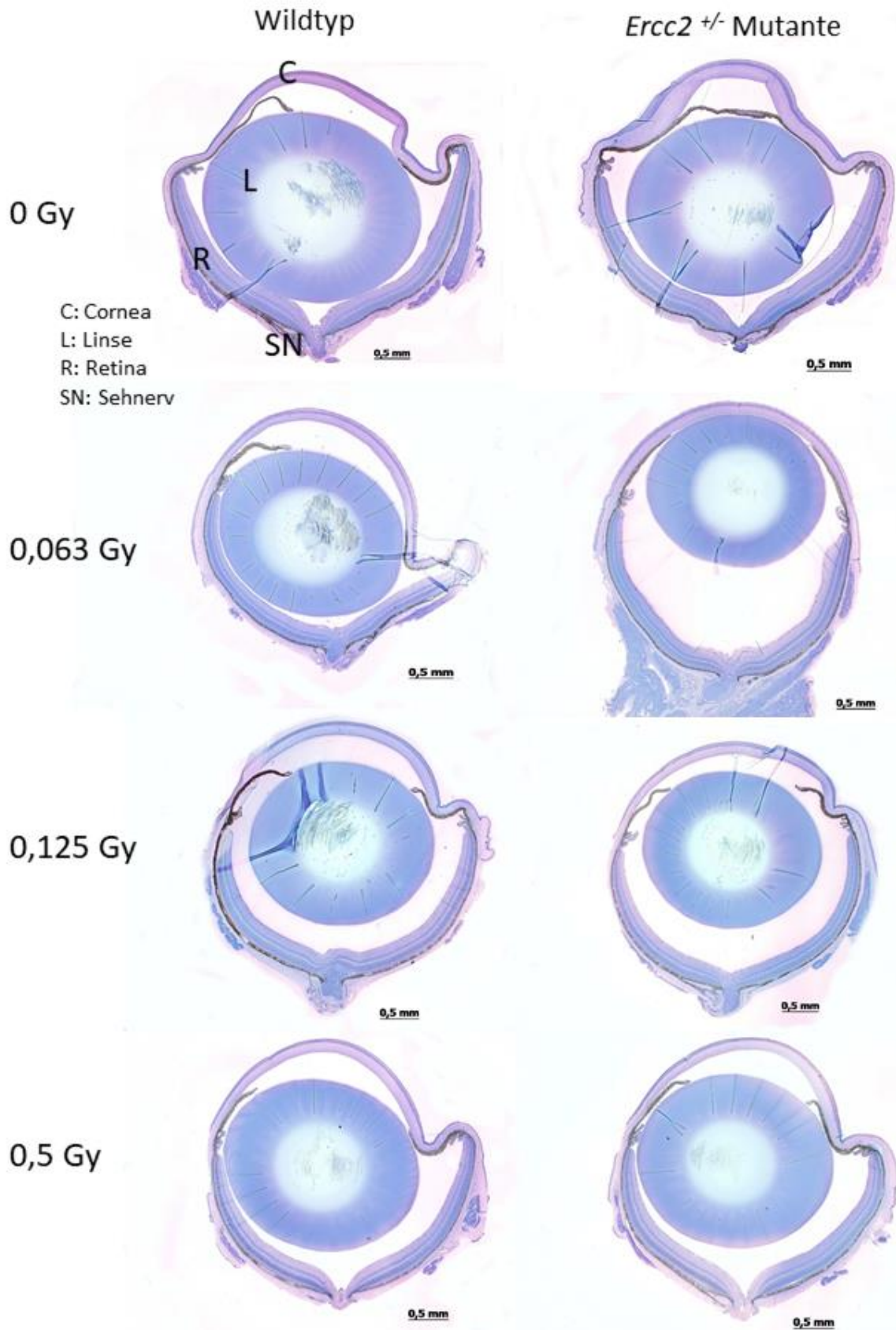


Abbildung 5: Histologie 4 h nach Bestrahlung dient als Normalbefund; Wildtyp (WT) und Mutante ($Ercc2^{+/-}$) von männlichen Proben im Vergleich jeweils unbestrahlt, mit 0 Gy, 0,063 Gy, 0,125 Gy und 0,5 Gy bestrahlt. Morphologisch ist zwischen den Gruppen kein Unterschied zu erkennen. Größenbalken 0,5 mm. Diese Beispiele dienen zur Illustration der 2-3 untersuchten Proben.

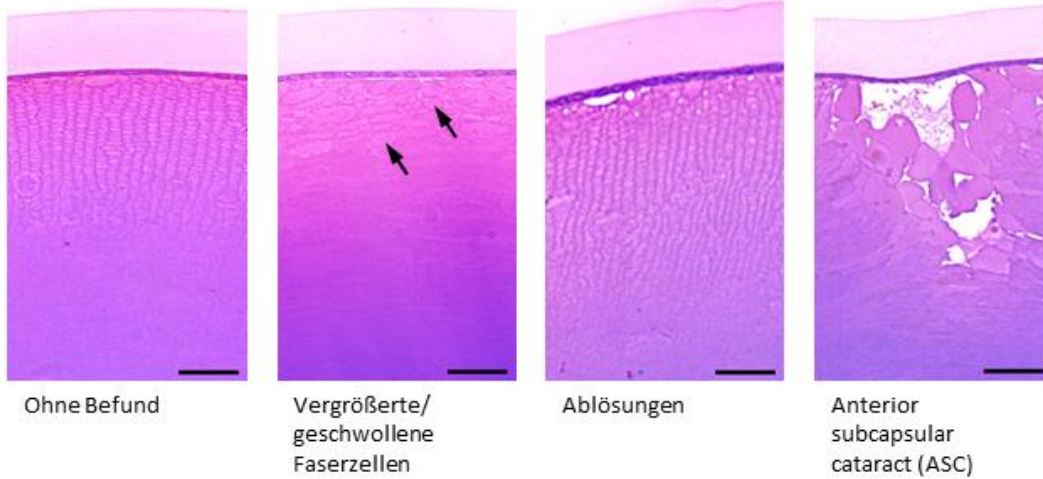
Ergebnisse

Proben der Untersuchungszeitpunkte 4 h (Normalbefund), 12 Monate, 18 Monate und 24 Monate nach Bestrahlung wurden genau analysiert. Dazu wurden von allen Augen Schnitte der Sehnerv-Ebene angefertigt und im Detail betrachtet. Hierfür wurde in 20facher Vergrößerung der anteriore Linsenbereich, der Linsenbogen und der posteriore Linsenbereich eingehend untersucht (siehe Abb. 6). Auch weitere Auffälligkeiten der Linsenmitte, Veränderungen im Cortex der Linse oder der Retina wurden aufgezeichnet. Zum besseren Vergleich ist jeweils ein Bild ohne Befund aus den Kategorien a) anterior, b) Linsenbogen und c) posterior gezeigt. Für den anterioren Linsenbereich (Abb. 6 a) sind beispielhaft Abbildungen für vergrößerte / geschwollene Faserzellen, Ablösungen und anterior subkapsuläre Katarakt (ASC) dargestellt. Vergrößerte / geschwollene Faserzellen konnten auch im Linsenbogen (Abb. 6 b) nachgewiesen werden, ebenso delokalisierte Zellkerne und Risse. Die histologische Detailuntersuchung des posterioren Linsenbereichs (Abb. 6 c) zeigte vergrößerte / geschwollene Faserzellen und delokalisierte Zellkerne. Im besonderen Interesse waren posteriore subkapsuläre Katarakte (PSC).

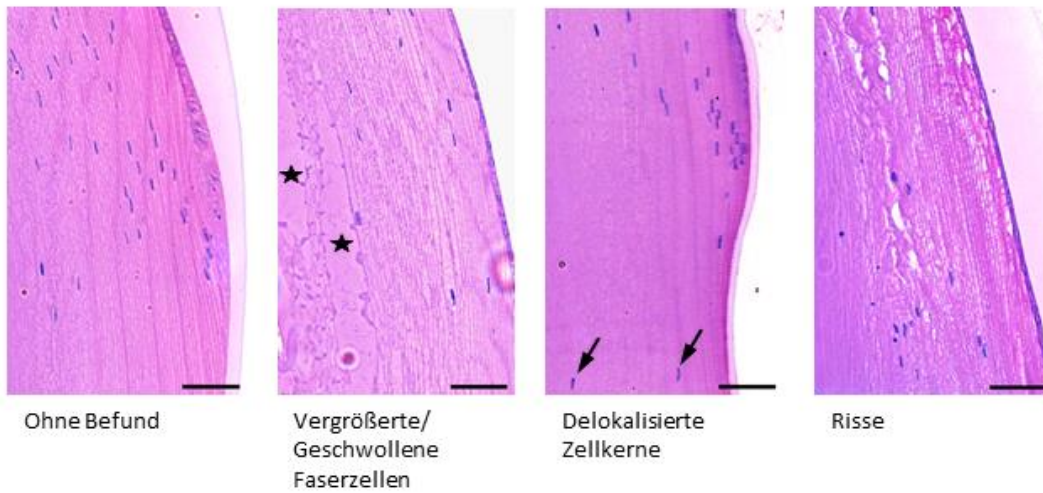
Die Auswertung dieser Daten wurde in Tabelle 2-5 für jede Untersuchungsgruppe zusammengefasst. Eine detaillierte Erfassung der einzelnen Augen mit zugehöriger Identifikationsnummer der Maus befindet sich im Anhang (Tabellen 12-15).

Ergebnisse

a) Anterior



b) Linsenbogen



c) Posterior

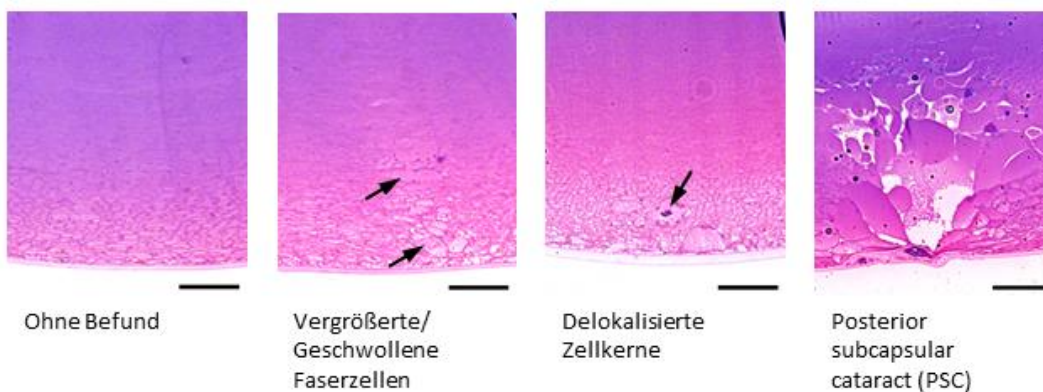
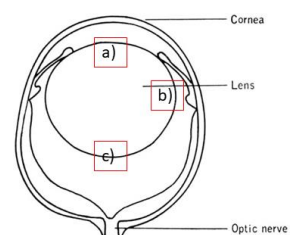


Abbildung 6: Übersicht über histologischen Veränderungen der Linse im a) anterioren Bereich, b) Linsenbogen und c) posterioren Bereich. Es sind jeweils die Veränderungen im Vergleich zu einem histologischen Schnitt ohne Befund dargestellt. Die untersuchten Kriterien waren vergrößerte/geschwollene Faserzellen, Ablösungen, ASC, delokalisierte Zellkerne, Risse, PSC. Der Größenbalken entspricht 50 μm



4.1.1 Befundung 4 h nach Bestrahlung

Im Normalbefund 4 h nach der Bestrahlung (Tabelle 2) ist zu sehen, dass besonders im anterioren Bereich besonders viele Auffälligkeiten vorhanden sind. So sind in 9 von 44 Schnitten vergrößerte oder geschwollene Faserzellen beobachtet worden, davon 7 bei den Weibchen. Da dies als Normalbefund festgelegt wurde, soll das nicht weiter irritieren, ist jedoch für die späteren Zeitpunkte eventuell noch von Interesse. Außerdem konnten in 7 Schnitten anterior Ablösungen verzeichnet werden, sowie 19 Fälle mit kleinen Vakuolen. Eine geschlechtsspezifische Verteilung war hier nicht zu beobachten. Dies zeigt, dass bei 10-Wochen alten Tieren bereits morphologisch viele kleine Abweichungen zu erkennen sind. Es sind aber, wie erwartet, keine Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten (engl. „sham irradiated“, hier abgekürzt „sham“) 4 h nach der Bestrahlung festzustellen. Die genauen Einflüsse der Zeit nach der Bestrahlung, der Dosis, sowie des Geschlechts werden in der statistischen Analyse in 4.1.5 beschrieben.

Ergebnisse

Tabelle 2: Zusammenfassung der histologischen Befunde 4 h nach Bestrahlung

Sample	Anterior						Linsenbogen				Posterior						Nucleus	zusätzliche Änderungen		
	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	Ablosungen	kleine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	kleine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	kleine Vakuolen	Posterior Subcapsular Cataract (PSC)	Risse	delokalisierte Zellkerne	2 Zentren		kleine Vakuolen	Retina	delokalisierte Zellkerne im Cortex
4h WT m sham			2/2																	
4h Mut m sham																				
4h WT m 63mGy	1/3	1/3	1/3												1/3			1/3		
4h Mut m 63mGy		1/4			1/4															
4h WT m 125mGy			3/3																	
4h Mut m 125mGy		1/3	1/3																	
4h WT m 0.5Gy	1/2		1/2																	
4h Mut m 0.5Gy			2/2																	
4h WT f sham		1/3	1/3																	
4h Mut f sham			1/2																	
4h WT f 63mGy	2/3	1/4	1/3														1/3			
4h Mut f 63mGy	1/4	1/4	1/4		1/4											1/4				
4h WT f 125mGy	1/3																			
4h Mut f 125mGy	1/3	1/3	2/3																	
4h WT f 0.5Gy	1/3		1/3																	
4h Mut f 0.5Gy	1/3	1/3	2/3																	
Total 44	9	7	19	0	2	0	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1

4.1.2 Befundung 12 Monate nach Bestrahlung

Auffällig ist bei den Schnitten der Augen von den Tieren 12 Monate nach Bestrahlung (Tabelle 3), dass im anterioren Bereich in vielen Schnitten vergrößerte und geschwollene Faserzellen zu beobachten waren (in 33 von 43 Augen). Im posterioren Bereich ist dies bei 17 von 43 Augen zu sehen. Weitere häufige Veränderungen sind Ablösungen (anterior), kleine Vakuolen (Linsenbogen und posterior) und delokalisierte Zellkerne (posterior). Anteriore subkapsuläre Katarakte sind 12 Monate nach Bestrahlung keine zu verzeichnen. Hingegen gibt es drei Fälle von posterior subkapsulären Katarakten, jeweils bei 0,5 Gy bestrahlten Tieren (2 Wildtyp, 1 Mutante von insgesamt 10 Tieren).

Ergebnisse

Tabelle 3: Zusammenfassung der histologischen Befunde 12 Monate nach Bestrahlung

Histology 12 M p.i.	Anterior						Linsnbogen						Posterior						Nucleus		zusätzliche Änderungen	
	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	Ablösungen	kleine Vakuolen	Risse	dekalisierte Zellkerne	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	keine Vakuolen	Risse	dekalisierte Zellkerne	vergrößerte/geschw ollene Faserzellen	keine Vakuolen	Posterior Subcapsular Catract (PSC)	Risse	dekalisierte Zellkerne	2 Zentren	keine Vakuolen	Retina	dekalisierte Zellkerne im Cortex			
Sample																						
12M WT m sham	1/2	1/2			1/2		1/2								1/2			1/2				
12M Mut m sham	1/2						1/3								1/3							
12M WT m 63mGy		2/3							1/3		2/3				1/3							
12M Mut m 63mGy	3/3	1/3			2/3					3/3												
12M WT m 125mGy	2/3	1/3			2/3		1/3															
12M Mut m 125mGy	2/2				1/2				1/2		1/2					1/2						
12M WT m 0.5Gy	2/3	2/3													1/3							
12M Mut m 0.5Gy	3/3	2/3		3/3			1/3								2/3		1/3					
12M WT f sham	3/3	1/3			1/3		1/3		1/3		2/3				2/3							
12M Mut f sham	2/3														1/3			1/3				
12M WT f 63mGy	3/3	2/3			1/3		1/3	1/3			1/3											
12M Mut f 63mGy	3/3	1/3			1/3										2/3							
12M WT f 125mGy	2/3	1/3					3/3				1/3				1/3							
12M Mut f 125mGy	2/3	1/3					1/3				2/3				1/3							
12M WT f 0.5Gy	2/2	2/2		1/2	1/2		1/2				2/2				1/2							
12M Mut f 0.5Gy	2/2	1/2			1/2		1/2	1/2			2/2											
Total 43	33	18	0	4	9	0	1	13	2	4	18	17	3	0	15	2	2	2	0	0		

4.1.3 Befundung 18 Monate nach Bestrahlung

Für die Augen-Schnitte von den Tieren 18 Monate nach Bestrahlung sind die histologischen Befunde in Tabelle 4 aufgelistet. Hier sind von den insgesamt 43 Proben mehrere Merkmale auffällig; in der anterioren Linse sind vielfach vergrößerte/geschwollene Faserzellen (33) zu verzeichnen, aber auch Ablösungen (28), sowie delokalisierte Zellkerne (22). Im Linsenbogenbereich sind 26 Fälle von kleinen Vakuolen zu beobachten gewesen. Im posterioren Bereich waren insgesamt 34 Fälle mit kleinen Vakuolen zu finden, außerdem vergrößerte/geschwollene Faserzellen (15) und delokalisierte Zellkerne (23). Es gibt nur ein Auge mit einer anterioren subkapsulären Katarakt (WT f 0,5 Gy), allerdings gibt es insgesamt 11 mal die Beobachtung einer posterior subkapsulären Katarakt (PSC). Einmal bei einer scheinbestrahlten Probe, einmal bei einer Probe, die mit 63 mGy bestrahlt wurde, zweimal nach einer Bestrahlung mit 125 mGy und sieben mal bei einer Dosis von 0,5 Gy. Es gibt insgesamt 11 Proben in der Gruppe 0,5 Gy, wovon 7 mit einer PSC befundet wurden, was eine deutliche Erhöhung von PSCs im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen ist. Dies wird in der statistischen Auswertung genauer erläutert (siehe Kapitel 4.1.5).

Ergebnisse

Tabelle 4: Zusammenfassung der histologischen Befunde 18 Monate nach Bestrahlung

Sample	Anterior						Linsnbogen						Posterior						Nucleus	keine Vakuolen	Retina	delokalisierte Zellkerne im Cortex
	vergrößerte/geschwollene Faserzellen	Ablosungen	keine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	vergrößerte/geschwollene Faserzellen	keine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne	vergrößerte/geschwollene Faserzellen	keine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne	Posterior Subcapsular Cataract (PSC)	keine Vakuolen	Risse	delokalisierte Zellkerne				
18M WT m sham	2/3	2/3			1/3		1/3	3/3				3/3			2/3			1/3	1/3			
18M Mut m sham	1/2	1/2			1/2		1/2	1/2				1/2			1/2			1/2				
18M WT m 63mGy	2/3	1/3			1/3		1/3	1/3				2/3			3/3			3/3	1/3			
18M Mut m 63mGy	2/3	2/3			1/3		2/3	2/3				1/3			1/3			2/3				
18M WT m 125mGy	2/3	3/3			1/3		1/3	1/3				3/3										
18M Mut m 125mGy	1/2				1/2		1/2	1/2				1/2			2/2							
18M WT m 0.5Gy	2/3	2/3			1/3		2/3	1/3				3/3			1/3			1/3				
18M Mut m 0.5Gy	2/2	1/2			1/2		1/2	1/2				1/2			2/2			2/2				
18M WT f sham	2/2	2/2			1/2		1/2	1/2				2/2										
18M Mut f sham	2/2	1/2			1/2		1/2	1/2				1/2			1/2			2/2				
18M WT f 63mGy	3/3	3/3			3/3		1/3	1/3				3/3							1/3			
18M Mut f 63mGy	3/3	3/3			1/3		1/3	3/3				3/3						1/3	1/3			
18M WT f 125mGy	3/3	2/3			2/3		2/3	2/3				2/3			2/3			3/3				
18M Mut f 125mGy	1/3				2/3		2/3	2/3				3/3						2/3	1/3			
18M WT f 0.5Gy	2/3	2/3			1/3		1/3	2/3				2/3			2/3			3/3				
18M Mut f 0.5Gy	3/3	3/3			1/3		2/3	3/3				3/3			2/3			2/3				
Total 43	33	28	0	7	22	1	4	26	0	0	34	15	11	23	5	0	0	23	5			

Ergebnisse

Für die Augen-Schnitte von Mäusen 24 Monate nach der Bestrahlung sind die Daten in Tabelle 5 erfasst. Hier gab es insgesamt 41 Proben. Im anterioren Bereich wurden bei 26 Proben vergrößerte/geschwollene Faserzellen erfasst und 21 Proben zeigten delokalisierte Zellkerne. Im Linsenbogen konnten in 30 Linsen kleine Vakuolen verzeichnet werden. Der posteriore Bereich fiel besonders durch kleine Vakuolen (38) und delokalisierte Zellkerne (16) auf. Auch hier gab es anterior einen Fall von subkapsulärer Katarakt (WT f 0,5 Gy). PSCs konnten hier insgesamt bei 6 Augen gezeigt werden, wobei vier davon bei einer Dosis von 0,5 Gy zu beobachten waren (2 w, 2 m) und bei den Weibchen noch jeweils ein Fall bei unbestrahlten bzw. 63 mGy Proben.

4.1.5 Statistische Erfassung der Histologie

Zur abschließenden Beurteilung der histologischen Befundung wurden die Daten statistisch erfasst und das Chancenverhältnis mit dem zugehörigen 95%igem Konfidenzintervall berechnet (siehe Tabellen 6-8). Für die Berechnung der Abhängigkeit von der Dosis, wurden die unbestrahlten 0 Gy Proben als Referenz herangezogen und der Effekt der Dosen 0,063 Gy, 0,125 Gy und 0,5 Gy ermittelt. Weil 4 h nach der Bestrahlung keine morphologischen Veränderungen aufgetreten sind (vgl. 4.1.1), wurden für den Faktor Zeit die 4 h Werte als Referenz verwendet. Somit ergibt sich ein Wert für die Auswirkungen 12 Monate, 18 Monate und 24 Monate nach Bestrahlung. Ein Geschlechtsunterschied wurde ebenfalls berechnet („Maus männlich“) und der genetische Unterschied ebenfalls („Maus Mutante“). Das Chancenverhältnis ist für die Kategorien vergrößerte / geschwollene Faserzellen, Ablösungen, kleine Vakuolen, delokalisierte Zellkerne anteriore oder posteriore subkapsuläre Katarakte angegeben. Statistisch signifikante Werte sind farblich unterlegt, um die Erfassung zu vereinfachen.

Die statistische Auswertung zu den Veränderungen im anterioren Bereich ist in Tabelle 6 dargestellt. Vergrößerte/geschwollene Faserzellen wurden für 12, 18 und 24 Monate nach Bestrahlung im Vergleich zu den 4 h Werten als statistisch signifikant erfasst (12 Monate: 14,82 [Konfidenzintervall CI: 5,06; 43,46], 18 Monate: 14,82 [CI: 5,0; 43,45], 24 Monate: 7,92 [CI: 2,84; 22,12]). Dies zeigt, dass die Zunahme der vergrößerten oder geschwollenen Faserzellen altersbedingt ist und bei 12 und 18 Monaten stärker ausgeprägt ist. Zusätzlich sind geschwollene oder vergrößerte Faserzellen für das Merkmal „Weiblich“ signifikant, da das Chancenverhältnis bei dem Merkmal „Männlich“ mit 0,29 (CI: 0,14-0,61) berechnet. Dies bedeutet, dass vergrößerte oder geschwollene Faserzellen im anterioren Bereich mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit bei weiblichen Tieren gefunden

Ergebnisse

werden können. Dies ist auch in den bei den Befunden der Tiere 12-24 Monate nach Bestrahlung (in Tabellen 2-5) zu sehen, da dort tendenziell mehr weibliche Tiere mit vergrößerten/geschwollenen Faserzellen beobachtet werden konnten. Ablösungen konnten signifikant häufiger bei Tieren 12 und 18 Monate nach der Bestrahlung aufgefunden werden (12 Monate: 3,79 [CI: 1,38; 10,43] 18 Monate: 9,54 [CI: 3,41; 26,71]), sowie häufiger bei Wildtyp-Mäusen (Mutant 0,46 [CI: 0,24; 0,92]). Eine signifikant erhöhte Anzahl an Rissen konnte anterior bei Schnitten 18 und 24 Monaten nach der Bestrahlung gefunden werden (18 Monate: 17,44 [CI: 1,11; 274,80], 24 Monate: 24,41 [CI: 1,57; 379,56]). Ebenso konnten bei der bei den 12-24-Monats-Gruppe mit steigender Tendenz vermehrt delokalisierte Zellkerne gefunden werden (12 Monate: 4,84 [CI: 1,13; 20,70], 18 Monate: 18,59 [CI: 4,56; 75,82], 24 Monate: 19,12 [CI: 4,64; 78,80]). Dies bedeutet, dass bei 12, 18 und 24 Monaten nach der Bestrahlung häufiger delokalisierte Zellkerne vorkommen als bei den Schnitten 4 h nach der Bestrahlung. Diese Beobachtung lässt sich anhand der Zunahme von Fällen mit delokalisierten Zellkernen in den histologischen Schnitten bestätigen (siehe Tabellen 2-5).

Tabelle 6: Anteriore Linse. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben und farblich markiert

	Vergrößerte/geschwollene Faserzellen	Ablösungen	Kleine Vakuolen	Risse	Delokalisierte Zellkerne	Subcapsuläre Katarakt
Strahlung (Referenz 0 Gy)						
0,063 Gy	1,41 [0,50; 3,97]	2,10 [0,79; 5,55]	0,48 [0,11; 2,19]	0,87 [0,24; 3,17]	1,61 [0,58; 4,48]	1,00 [0,04; 24,11]
0,125 Gy	0,72 [0,26; 2,01]	1,13 [0,42; 3,08]	0,75 [0,17; 3,30]	0,54 [0,13; 2,25]	1,60 [0,57; 4,51]	0,98 [0,04; 23,86]
0,5 Gy	1,02 [0,36; 2,87]	1,49 [0,55; 4,04]	0,97 [0,22; 4,27]	1,31 [0,38; 4,48]	0,73 [0,25; 2,12]	4,74 [0,36; 61,68]
Zeit (Referenz 4 h)						
12 Monate	14,82 [5,06; 43,46]	3,79 [1,38; 10,43]	0,02 [0,00; 0,22]	9,92 [0,60; 164,89]	4,84 [1,13; 20,70]	1,26 [0,05; 31,96]
18 Monate	14,82 [5,05; 43,45]	9,54 [3,41; 26,71]	0,02 [0,00; 0,22]	17,44 [1,11; 274,80]	18,59 [4,56; 75,82]	3,20 [0,21; 49,22]
24 Monate	7,92 [2,84; 22,12]	2,48 [0,88; 7,05]	0,11 [0,03; 0,40]	24,41 [1,57; 379,56]	19,12 [4,64; 78,80]	3,40 [0,22; 53,27]
Maus männlich	0,29 [0,14; 0,61]	0,91 [0,46; 1,79]	1,75 [0,62; 4,93]	0,79 [0,31; 1,98]	0,80 [0,39; 1,64]	0,20 [0,02; 1,72]
Maus Mutante	0,99 [0,48; 2,01]	0,46 [0,24; 0,92]	0,62 [0,22; 1,73]	0,87 [0,35; 2,19]	1,29 [0,63; 2,64]	0,24 [0,03; 1,93]

Ergebnisse

Die statistische Auswertung für den Linsenbogen-Bereich ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem Merkmal „kleine Vakuolen“ und dem Alter. 12, 18 und 24 Monate nach der Bestrahlung ist die Anzahl an kleinen Vakuolen signifikant erhöht (12 Monate: 7,60 [CI: 1,84; 31,41], 18 Monate: 26,22 [CI: 6,40; 107,42] und 24 Monate: 46,92 [CI:10,99; 200,35]). Betrachtet man die histologischen Befunde, so wird schnell klar, dass hier eine Zunahme der kleinen Vakuolen mit dem Alter vorhanden ist; bei 12 Monaten nach Bestrahlung sind es 13 Fälle, bei 18 Monaten nach Bestrahlung sind es 26 Fälle und bei 24 Monaten nach Bestrahlung sind es 30 Fälle. Da der Bezug immer zu den 4 h -Werten gesetzt wird (2 Fälle), ist auch klar, dass durch das vermehrte Vorkommen von kleinen Vakuolen bei höherem Alter die Signifikanz zunimmt. Außerdem ist die Anzahl von Rissen 24 Monate nach der Bestrahlung signifikant erhöht (6,06 [CI: 1,04; 35,46]).

Tabelle 7: Linsenbereich. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben und farblich markiert

	Vergrößerte/geschwollene Faserzellen	Kleine Vakuolen	Risse	Delokalisierte Zellkerne
Strahlung (Referenz 0 Gy)				
0,063 Gy	0,70 [0,15; 3,21]	0,95 [0,34; 2,66]	5,70 [0,31; 105,95]	0,81 [0,15; 4,51]
0,125 Gy	0,34 [0,05; 2,23]	1,04 [0,37; 2,97]	5,58 [0,30; 103,66]	0,50 [0,07; 3,50]
0,5 Gy	0,56 [0,11; 2,91]	0,69 [0,24; 2,00]	14,64 [0,88; 244,03]	0,90 [0,16; 5,04]
Zeit (Referenz 4 h)				
12 Monate	0,95 [0,11; 8,19]	7,60 [1,84; 31,41]	1,98 [0,28; 14,02]	3,07 [0,54; 17,51]
18 Monate	3,16 [0,52; 19,13]	26,22 [6,40; 107,42]	0,33 [0,02; 6,62]	0,32 [0,02; 5,72]
24 Monate	2,38 [0,37; 15,30]	46,92 [10,99; 200,35]	6,06 [1,04; 35,46]	1,70 [0,26; 11,31]
Maus männlich	3,31 [0,88; 12,34]	0,50 [0,24; 1,05]	0,42 [0,12; 1,54]	1,35 [0,38; 4,83]
Maus Mutante	2,17 [0,63; 7,42]	0,96 [0,47; 1,99]	1,35 [0,39; 4,66]	0,47 [0,12; 1,78]

Ergebnisse

Tabelle 8: Posteriore Linse. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben und farblich markiert

	Vergrößerte/geschwollene Faserzellen	Kleine Vakuolen	Risse	Delokalisierte Zellkerne	Subcapsuläre Katarakt
Strahlung (Referenz 0 Gy)					
0,063 Gy	0,89 [0,35; 2,28]	1,65 [0,52; 5,21]	1,47 [0,20; 10,87]	0,97 [0,36; 2,65]	0,82 [0,14; 5,00]
0,125 Gy	0,64 [0,24; 1,71]	1,42 [0,44; 4,57]	0,93 [0,11; 8,19]	0,95 [0,34; 2,62]	0,85 [0,14; 5,21]
0,5 Gy	0,44 [0,16; 1,22]	1,98 [0,60; 6,57]	0,25 [0,01; 4,88]	1,22 [0,44; 3,34]	9,28 [2,08; 41,31]
Zeit (Referenz 4 h)					
12 Monate	5,87 [1,85; 18,68]	12,67 [3,13; 51,35]	1,11 [0,04; 31,72]	13,75 [2,48; 76,38]	9,30 [0,47; 182,33]
18 Monate	4,85 [1,51; 15,55]	61,96 [14,28; 268,87]	1,12 [0,04; 32,22]	31,10 [5,67; 170,71]	46,52 [2,61; 829,14]
24 Monate	5,23 [1,62; 16,90]	190,48 [35,50; 999,99]	11,20 [0,85; 148,12]	17,88 [3,22; 99,21]	19,62 [1,08; 357,87]
Maus männlich	1,58 [0,79; 3,16]	0,51 [0,22; 1,17]	2,43 [0,47; 12,54]	0,81 [0,40; 1,63]	0,55 [0,19; 1,57]
Maus Mutante	0,66 [0,33; 1,31]	0,95 [0,42; 2,14]	2,57 [0,50; 13,20]	1,01 [0,50; 2,04]	1,20 [0,43; 3,37]

Auch im posterioren Bereich (Tabelle 8) ist eine Zunahme der vergrößerten/geschwollenen Faserzellen zu verzeichnen. Da im Normalbefund nur 4 Schnitte mit vergrößerten oder geschwollenen Faserzellen gefunden wurden und die Zahl im Alter deutlich ansteigt (Tabelle 3-5), ist dies auch signifikant für 12 Monate (5,87 [CI: 1,85; 18,68]), 18 Monate (4,85 [CI: 1,51; 15,55]) und 24 Monate (5,23 [CI: 1,62; 16,90]). Ähnlich wie bei der Auswertung vom Linsenbogen ist auch im posterioren Bereich eine Zunahme der kleinen Vakuolen mit dem Alter zu sehen (12 Monate: 12,67 [CI: 3,13; 51,35], 18 Monate 61,96 [CI: 14,28; 268,87], 24 Monate 190,48 [CI: 35,50; 999,99]). Dies ist auch durch die histologische Befundung in den Tabellen 2-5 deutlich, da im Normalbefund (4 h nach der Bestrahlung, Tabelle 2) nur 2 Schnitte mit kleinen Vakuolen im posterioren Bereich gefunden wurden. 12 Monate nach der Bestrahlung waren es schon 18 Fälle, 18 Monate nach Bestrahlung 34 Fälle und 24 Monate nach Bestrahlung 38 Fälle. Außerdem ist im posterioren Bereich mit zunehmendem Alter die Anzahl der delokalisierten Zellkerne signifikant: 12 Monate 13,75 [CI: 2,48; 76,38], 18 Monate 31,10 [CI: 5,67; 170,71] und für 24 Monate etwas geringer 17,88 [CI: 3,22; 99,21].

Besonders interessant sind aber die signifikanten Zusammenhänge zwischen Strahlung und Alter in

Ergebnisse

Bezug auf posterior subkapsuläre Katarakte. Zum einen besteht hier eine signifikante Erhöhung des Vorkommens von PSCs bei den Schnitten der Mäuse 18 und 24 Monate nach Bestrahlung (18 Monate: 46,52 [CI: 2,61; 829,14], 24 Monate 19,62 [CI: 1,08; 357,87]), zum anderen bei einer Strahlendosis von 0,5 Gy und PSCs (9,28 [CI: 2,08; 41,31]). Dies ist der Beleg dafür, dass PSCs bereits nach einmaliger Bestrahlung mit 0,5 Gy im späteren Lebensverlauf entstehen können.

Es wurden auch die Chancenverhältnisse und Signifikanzen von weiteren Beobachtungen, wie im Nucleus „zwei Zentren“ (Abb. 7) oder „kleine Vakuolen“, aber auch Veränderungen in der Retina oder delokalisierte Zellkerne im Cortex aufgenommen (Tabelle 9). Da dies nur Nebenbeobachtungen und Einzelfälle waren, sind hier lediglich zwei Befunde statistisch signifikant: Der Befund „2 Zentren“ ist nach 24 Monaten signifikant erhöht (8,06 [CI: 1,40; 46,50] und delokalisierte Zellkerne sind in Weibchen leicht erhöht (Merkmal „Männlich“ 0,09 [CI: 0,01; 0,98]).

Tabelle 9: Nucleus/andere Beobachtungen. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben

	Nucleus: 2 Zentren	Nucleus: kleine Vakuolen	Retina	Cortex: deloka- lisierte Zellkerne
Strahlung (Referenz 0 Gy)				
0,063 Gy	2,39 [0,52; 11,05]	0,76 [0,10; 5,72]	0,54 [0,08; 3,62]	4,17 [0,20; 85,19]
0,125 Gy	2,68 [0,58; 12,44]	0,28 [0,02; 4,35]	0,94 [0,17; 5,09]	7,06 [0,39; 127,70]
0,5 Gy	1,25 [0,24; 6,70]	0,96 [0,13; 7,22]	0,58 [0,09; 3,92]	3,48 [0,17; 72,05]
Zeit (Referenz 4 h)				
12 Monate	2,69 [0,40; 17,91]	1,69 [0,28; 10,12]	1,69 [0,26; 10,94]	0,35 [0,02; 6,10]
18 Monate	4,50 [0,74; 27,32]	0,35 [0,02; 5,09]	0,35 [0,02; 5,91]	0,33 [0,02; 5,76]
24 Monate	8,06 [1,40; 46,50]	0,35 [0,02; 5,26]	2,53 [0,43; 15,05]	3,34 [0,53; 21,17]
Maus männlich	1,50 [0,56; 4,01]	0,67 [0,14; 3,25]	0,61 [0,16; 2,35]	0,09 [0,01; 0,98]
Maus Mutante	2,08 [0,77; 5,64]	1,66 [0,35; 7,98]	1,03 [0,28; 3,81]	0,37 [0,07; 1,98]

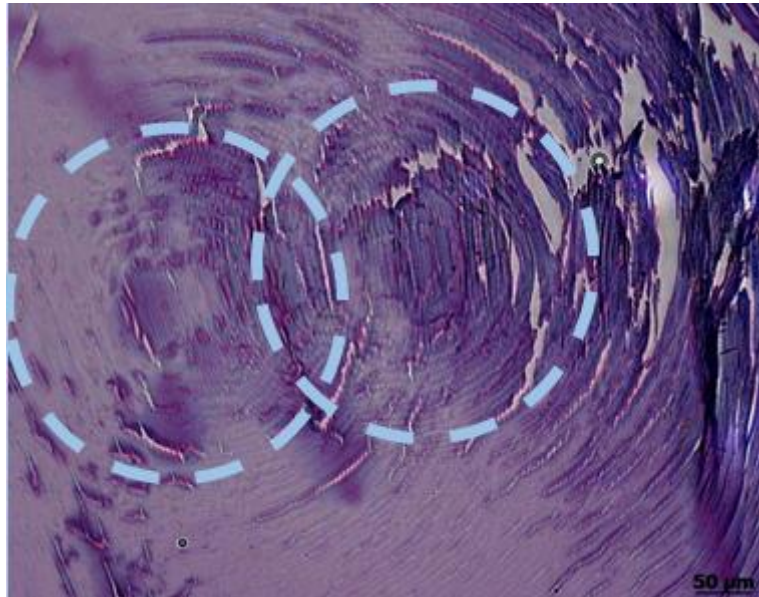


Abbildung 7: Beispielbild für die Beobachtung "zwei Zentren" in der Linsenmitte. Es scheint als ob im Nucleus zwei Zentren bestehen, um die sich die Linsenfaserzellen anordnen. Dieses Phänomen trat zufällig verteilt auf und lässt sich keinem Merkmal (Geschlecht, Genotyp oder Strahlendosis) zuordnen.

4.2 Immunhistochemische Ergebnisse 8-OHG

Zum Nachweis von nicht reparierten Schäden an den Basen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurde eine immunhistochemische Färbung von Schnitten mit einem Antikörper gegen 8-Hydroxyguanin (8-OHG) durchgeführt. Diese macht hydroxylierte Basen in RNA und DNA sichtbar (Pendergrass, 2008). In der Linse konnte nur eine schwache Färbung in der DNA und RNA in den Zellkernen (siehe Abb. 8) gezeigt werden. Allerdings wurden auch weitere Strukturen in der Linse angefärbt, die wahrscheinlich die Membranen der Faserzellen sind. Dies lässt auf eine unspezifische Färbung des Antikörpers schließen, was nur bedingt Schlüsse auf die spezifische Färbung im Zellkern zulässt. Ebenso wurden auch im Cytoplasma Strukturen angefärbt, was eine genaue Analyse der Färbungen erschwerte. Möglich ist auch, dass die Salzsäurebehandlung auf Plastik-Schnitten nicht richtig funktioniert und daher auch Proteine angefärbt werden. In Abbildung 8 ist der Vergleich von 8-OHG gefärbten Schnitten 4 h nach der Bestrahlung mit 0 Gy und 0,5 Gy vom Wildtyp und der Mutante gezeigt. Hier sieht man keine Unterschiede in der Verteilung der Färbung in den Zellkernen (DAPI), wo 8-OHG mit DAPI kolokalisiert zu sehen war. Es wurden auch Schnitte von späteren Zeitpunkten nach der Bestrahlung gefärbt, die zeigten jedoch ebenfalls kaum eine spezifische Färbung, was auch aufgrund des Abbaus von ROS eventuell 12-24 Monate nach der Bestrahlung nur

Ergebnisse

eingeschränkt möglich ist.

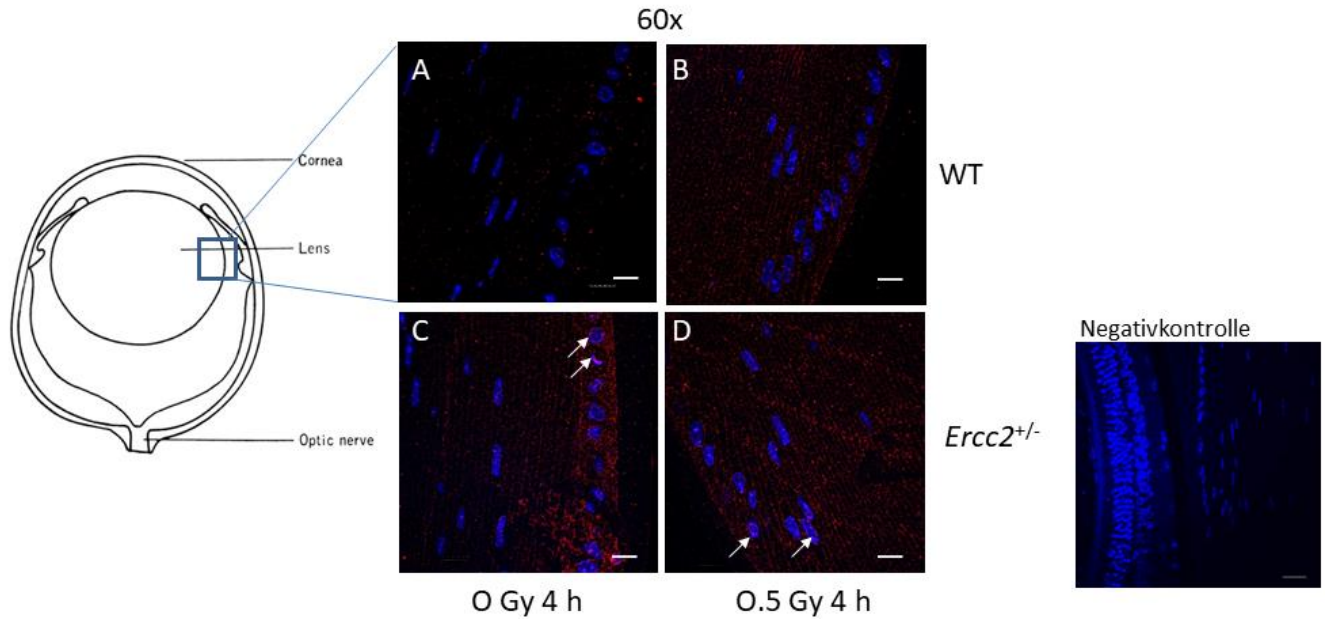


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen 8-OHG zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Beispielhaft gezeigt an einem Wildtyp (WT) und einer Mutante ($Ercc2^{+/-}$) in 60-facher Vergrößerung. Vergleich zwischen 0 Gy und 0.5 Gy nach 4 h. Die spezifische Färbung in den Zellkernen (blau) ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Größenbalken entspricht $20\ \mu\text{m}$

Besonders gut hat die Färbung in der Retina funktioniert (Abbildung 9). Hier war eine deutliche Färbung von Strukturen im Zellkern zu sehen. Am stärksten war die Färbung in der äußeren Körnerschicht der Retina. Hier war keine unspezifische Färbung anderer Strukturen zu beobachten. Auch hier ist in der Verteilung von bestrahlten/unbestrahlten Proben kein Unterschied zu sehen, genauso wie zwischen Wildtyp und Mutante. Die hohe Anfärbung in der Retina, besonders in der äußeren Körnerschicht, lässt auf die dortige hohe ROS-Aktivität schließen (vgl. Trick und Berkowitz, 2005). Dafür spricht auch, dass bei der nicht bestrahlten Probe (0 Gy) ein ähnliches Färbeergebnis zustanden kam (vgl. Abb.9). Ein Grund für die besseren Färbeergebnisse auf der Retina könnte die unterschiedliche Fixierung von Linse und Retina sein, sodass der Antikörper in der Retina einen besseren Zugang zu den Epitopen hat.

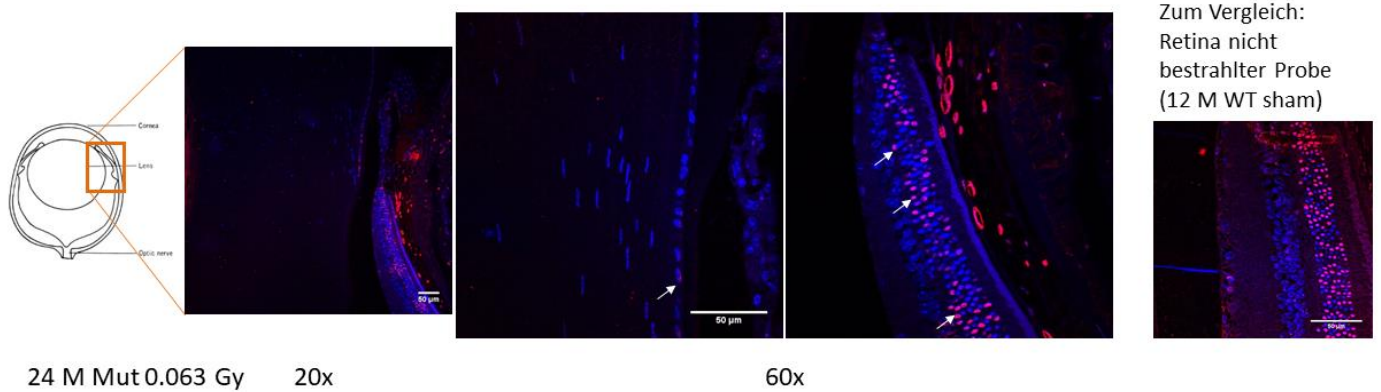


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen 8-OHG zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Beispielhafte Anfärbung eines Auges eines bestrahlten Tieres 24 M nach Bestrahlung mit 63 mGy in 20facher und 60facher Vergrößerung mit 8-OHG (rot), gegengefärbt mit DAPI (blau). Größenbalken beide Vergrößerungen 50 μm

4.3 Immunhistochemische Ergebnisse DNaseII β

DNaseII β ist bei der Differenzierung der Linsenfaserzellen und am Abbau der DNA beteiligt (Bassnett, 2009). Hier wurde ein Antikörper gegen DNaseII β verwendet, um eventuelle Abweichungen im Differenzierungsprozess der Linsenfaserzellen und Unterschiede im Kernabbau festzustellen. Dafür wurden Schnitte der Augen von Mäusen 4 h, 24 h, 12 M, 18 M und 24 Monate nach der Bestrahlung mit dem entsprechenden Antikörper angefärbt, jeweils Wildtyp- und Mutanten-Männchen.

Ergebnisse

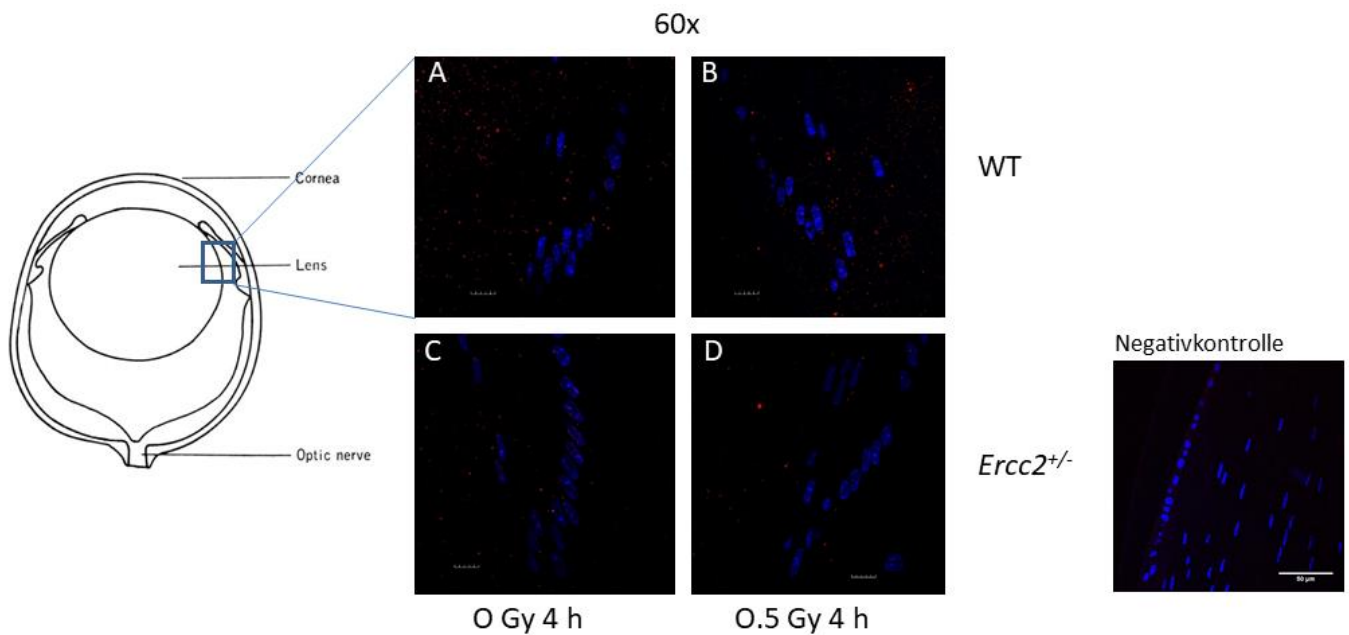


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen DNaseII β zur Übersicht des Linsenfaser-Differenzierungs-Prozesses. Vergleich von Schnitten mit 0 Gy und 0.5 Gy 4 h nach der Bestrahlung von Wildtypen (WT) und Mutante (*Ercc2*^{+/-}). Gegenfärbung Zellkerne DAPI (blau). Größenbalken 20 μ m.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, war die Färbung mit einem Antikörper gegen DNaseII β nur sehr schwach zu erkennen. Eine spezifische Färbung in den Zellkernen (DAPI) konnte kaum gezeigt werden, wohingegen eine Verteilung von DNaseII β scheinbar zufällig in der Linse (und auch außerhalb) vorzufinden war. Dies lässt keine vergleichenden Schlüsse zwischen Wildtyp und Mutante und den Bestrahlungsdosen zu. Die Differenzierung scheint zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt, da der Linsenbogen stets ausgebildet war und keine Abweichungen im Abbau der DNA festgestellt werden konnten. Der Abbau der Kerne scheint nicht beeinträchtigt zu sein, da hier keine intakten Zellkerne in der Organell-freien Zone (OFZ) vorzufinden sind.

4.4 Immunhistochemische Ergebnisse Ki67

Ki67 wird als Proliferationsmarker genutzt (Gerdes, 1990) und soll bei unserer Studie einen Hinweis darauf geben, ob die Bestrahlung einen Einfluss auf die Proliferation hat und wie sich die Bestrahlung auf die Proliferation auswirkt. Falls es zu einer Zu- oder Abnahme der Proliferationsaktivität je nach Dosis kommen würde, könnte dies zu einer Störung der Linsenstruktur beitragen. Um dies zu erfassen wurden Augen-Schnitte männlicher Tiere 4 h, 24 h, 12, 18 und 24 Monate nach der Bestrahlung mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt und miteinander verglichen.

Ergebnisse

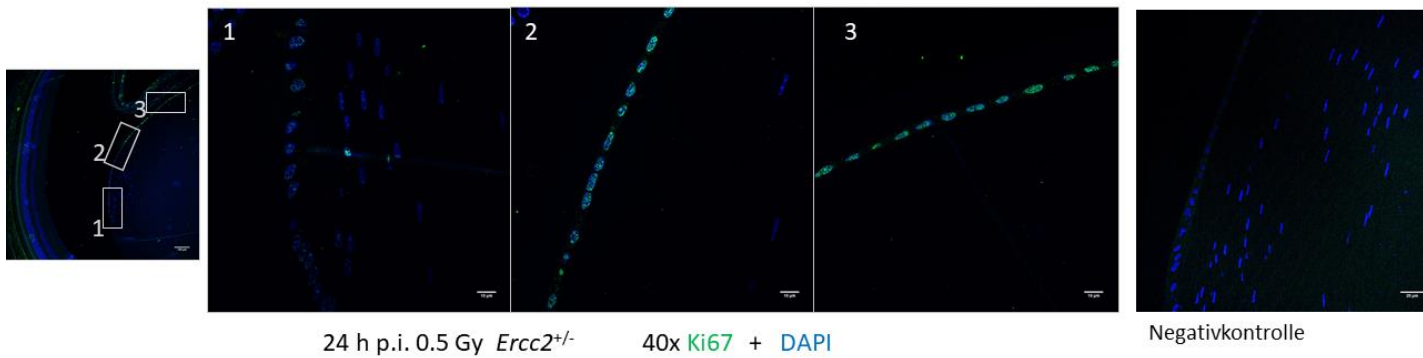


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67 zur Bestimmung der Proliferationsaktivität. Übersichtsbild (10x) zeigt schematisch wo 40x Vergrößerungen aufgenommen wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass die Färbung im ersten Abschnitt sehr gering ist. Im zweiten und dritten Bild ist die Färbung gleichmäßig über das Linsenepithel verteilt. Größenbalken 10x (Übersichtsbild): 100 μm , 40x (Bild 1, 2 und 3): 10 μm .

In Abbildung 11 ist beispielhaft die Färbung mit Ki67 gezeigt (24 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, Mutante). Es ist zu erkennen, dass die gesamten Kerne des Linsenepithels mit Ki67 (grün) angefärbt sind und keine stärker angefärbte Region, wie die proliferierende Zone, zu erkennen ist. Durch die gesamte und gleichmäßige Färbung konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen oder der Strahlendosis beobachtet werden (siehe Abb. 12). Lediglich in der jeweils ersten Vergrößerung zeigt sich, dass im Bereich des Linsenbogens die Färbung abnimmt, weil sich die Zellen hier nicht mehr teilen, sondern zu Faserzellen differenzieren (siehe dazu auch Bassnett, 2009).

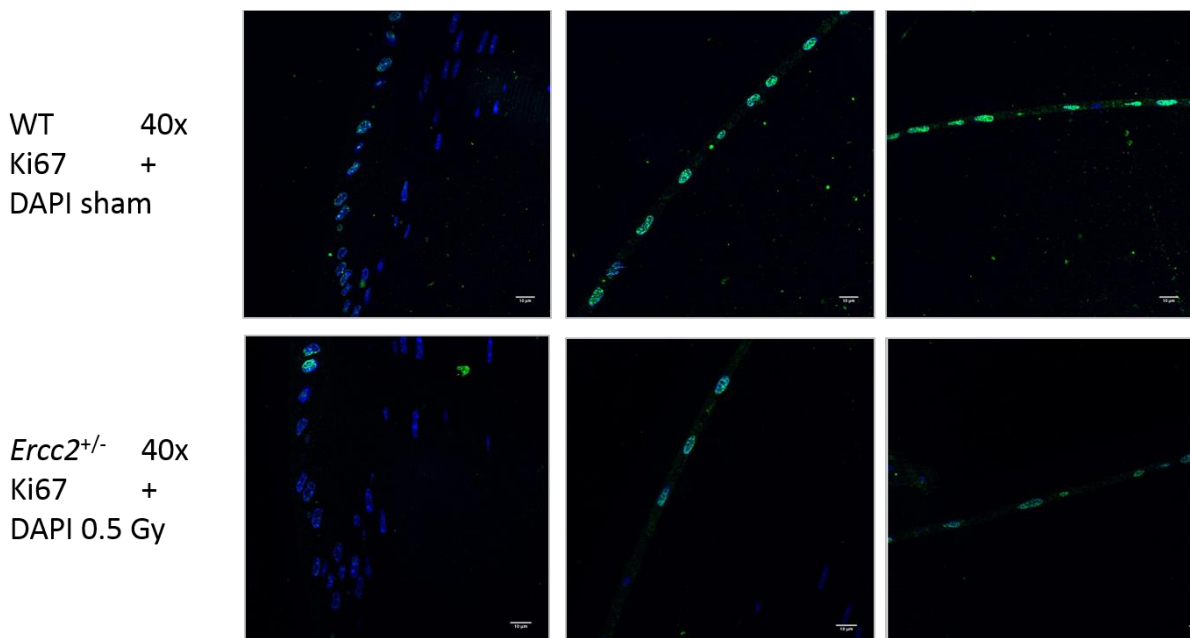


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67 zur Bestimmung der Proliferationsaktivität 4 h nach Bestrahlung. Es ist beispielhaft ein unbestrahlter Wildtyp gegen eine 0,5 Gy bestrahlte Mutante aufgezeigt. Die Farbverteilung ist bei beiden Genotypen und Strahlendosen vergleichbar und weist keine Unterschiede auf. Größenbalken 10 μm .

4.5 Ergebnisse Linsenorgankultur

Die Linse gilt als besonders strahlenempfindlich (Ainsbury et al., 2016), daher sollte die Reaktion der Linse als vollständiges Organ auf Strahlendosen in der Organkultur bestimmt werden. Dazu wurden Linsen von männlichen und weiblichen Tieren beider Genotypen isoliert, in Kultur gebracht und mit 0; 0,5 oder 1 Gy bestrahlt. Diese Dosen wurden verwendet, um Strahlenschäden zu induzieren. Die Linsen wurden 1 h, 4 h oder 24 h nach der Bestrahlung fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX und 53BP1 angefärbt. Diese beiden Antikörper wurden gewählt, um Doppelstrangbrüche (DSB) zu markieren (Burma et al., 2001 und Matsuda et al., 2011). Es wurde die Kombination beider Antikörper verwendet, da γ H2AX bei der Differenzierung der Linsenfaserzellen beim Abbau der DNA in der Linse vorkommt (Kunze et al., 2015). Hier markiert es die Doppelstrangbrüche, die beim Abbau der DNA bei der Linsenfaserzellendifferenzierung entstehen. Es markiert auch sehr stark den Übergang zur Organell-freien Zone. Um diesen Prozess auszuschließen, wurden nur kolokalisierte Färbungen mit 53BP1 im Linsenepithel ausgewertet.

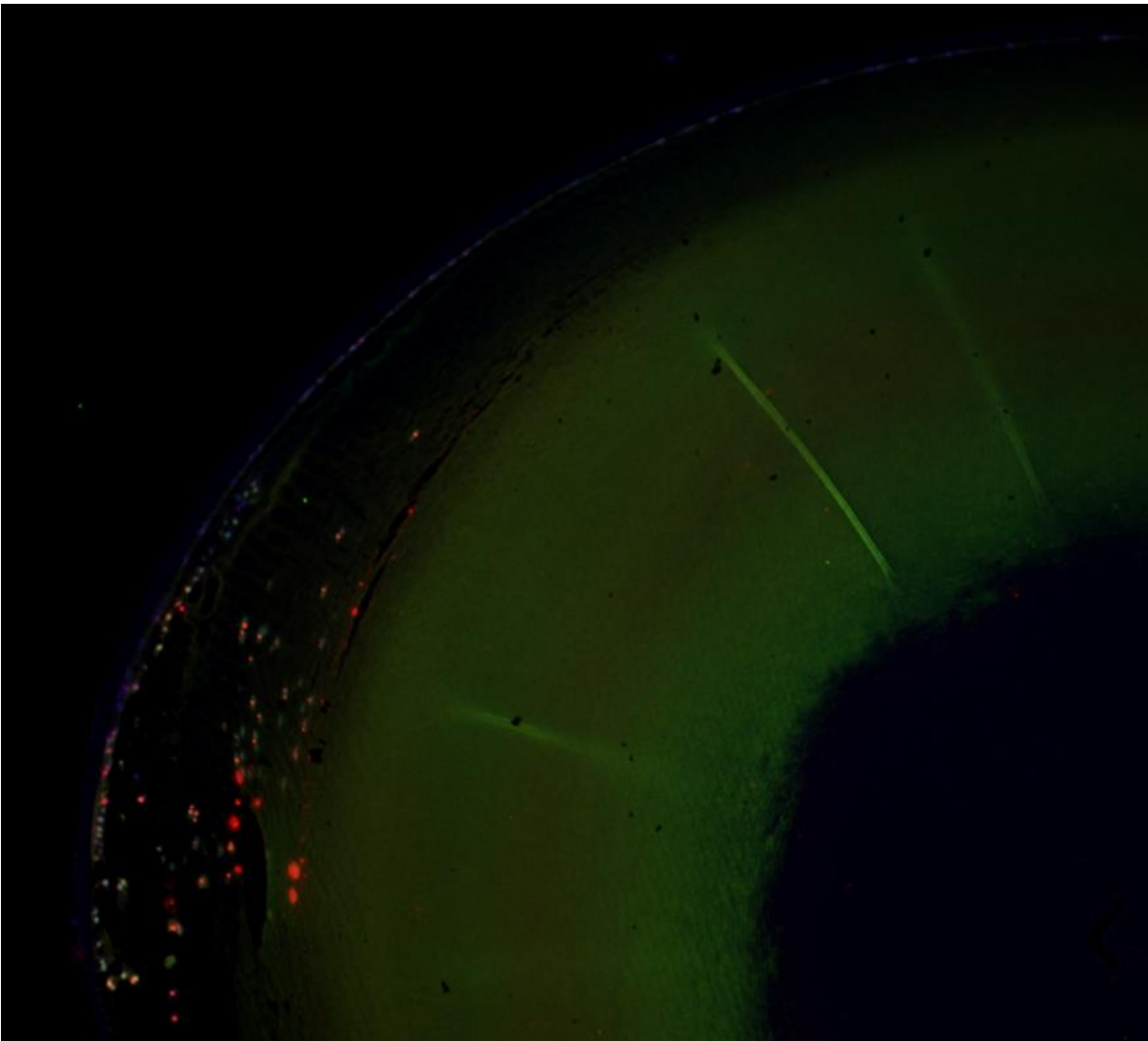


Abbildung 13: Schnitt einer Linse aus der Organkultur 4 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX (rot) und 53BP1 (grün) gefärbt, kolokalisierte Foci ergeben eine gelbe Färbung. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau), Vergrößerung 10x.

Für den Nachweis der Häufigkeit von DSB wurde die Expression von γ H2AX und 53BP1 im Linsenepithelzellen numerisch erfasst und nur kolokalisierte Färbungen gezählt. Es wurden 1-4 Linsenschnitte von 3-5 Tieren analysiert. Die Färbung ist exemplarisch in Abbildung 13 gezeigt, die Ergebnisse der gefärbten Zellen ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass es kaum Veränderungen im zeitlichen Verlauf bei der Färbung von γ H2AX und 53BP1 gab. Das gesamte Linsenepithel wurde für die Färbung gegen γ H2AX angefärbt, was ein Hinweis auf einen DNA-Abbau sein könnte. Es konnte keine Kolokalisation von γ H2AX und 53BP1 im Linsenepithel gezeigt werden, was eine Interpretation von Doppelstrangbrüchen erschwerte. In der Übergangszone (engl. *transition zone*), wo die Zellkerne abgebaut werden, sind im Linsenbogen einige Kolokalisationen von γ H2AX und 53BP1 zu erkennen. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch 53BP1 beim Abbau der DNA bei der Linsendifferenzierung beteiligt sein könnte.

Ergebnisse

Tabelle 10: Zusammenfassung der γ H2AX, 53BP1 und kolokalisierten gefärbten Linsene­pithelzellen auf Schnitten der Linsenorgankultur

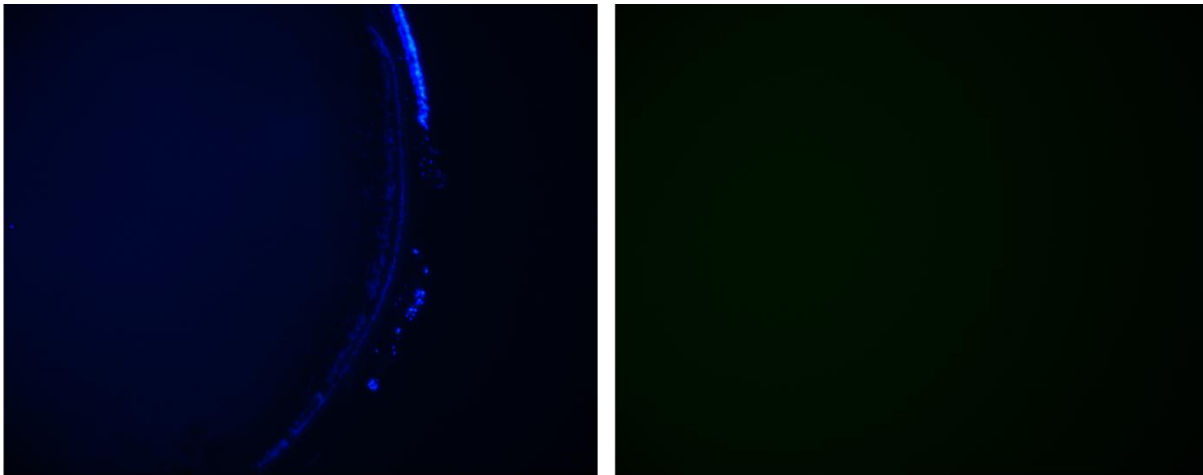
Stamm	Bestrahlung	Anzahl (n)	Zeit p.i.	53BP1	γ H2AX	kolokali­siert
WT f	0 Gy	1	1 h	0	34	2
		1	4 h	0	27	0
		1	24 h	1	25	1
Mut f	0 Gy	2	1 h	0	65	1,5
		2	4 h	0	59,5	0
		2	24 h	0,5	50,5	0
WT f	0,5 Gy	2	1 h	0	5,5	4
		2	4 h	3	12	8,5
		1	24 h	3	18	3
WT m	0,5 Gy	6	1 h	0,33	19,83	0
		4	4 h	0	24,5	0
		0	24 h	-	-	-
Mut f	0,5 Gy	2	1 h	2	36	0
		3	4 h	0,33	27,67	1,67
		4	24 h	0,25	47,75	0
Mut m	0,5 Gy	3	1 h	0	45,33	3,67
		3	4 h	1	51,33	2,33
		3	24 h	4,67	29,67	2,33
WT f	1 Gy	1	1 h	0	83	0
		1	4 h	4	29	5
		3	24 h	0	37	0
WT m	1 Gy	0	1 h	-	-	-
		1	4 h	0	11	0
		0	24 h	-	-	-
Mut f	1 Gy	3	1 h	1	30,33	0
		2	4 h	0	20,5	0
		3	24 h	0	75	0
Mut m	1 Gy	4	1 h	0,25	20,5	0
		3	4 h	0	13,67	0
		3	24 h	0	25,67	0

In Tabelle 10 ist zu erkennen, dass die überwiegende Färbung im Linsene­pithel nur γ H2AX ist und lediglich vereinzelt 53BP1 oder kolokalisierte Färbungen auftraten. Es ist außerdem festzuhalten, dass die γ H2AX Färbung auch in den Kontrollen bei 0 Gy zu sehen ist, was einen Zusammenhang mit der Strahlung ausschließt. Ebenfalls konnte bei den Kontrollen ein geringes Auftreten von 53BP1-Färbung oder kolokalisierten γ H2AX- und 53BP1-Färbung gezeigt werden. Dies deutet zusätzlich darauf hin, dass die Färbung unabhängig von der Strahlung erfolgte und auf DSB aufgrund anderer Ursachen hindeutet (s.o.). Daher sieht man auch keine erhöhte Anzahl von Färbungen bei 1 Gy

Ergebnisse

bestrahlten Linsen im Vergleich zu den 0,5 Gy bestrahlten Linsen. Da die hohe Anzahl an γ H2AX-positiven Färbungen im Linsenepithel aber sehr deutlich war, wurde rückgeschlossen, dass andere, äußere Einflüsse in der Linsenorgankultur zu Veränderungen im Linsenepithel geführt haben. Diese könnten durch Schäden beim Präparieren der Linsen entstanden sein oder durch ungünstige Bedingungen der Linsen in der Organkultur herbeigeführt worden sein (u.a. Sauerstoffversorgung oder Nährstoffversorgung).

Um zu überprüfen, ob die Linsen in der Organkultur apoptotisch waren und ein Teil der γ H2AX Signale daher rühren könnte, wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen *cleaved Caspase 3* durchgeführt. Dabei konnte keine Färbung festgestellt werden (siehe Abb. 14).



WT 1Gy 4 h 10x DAPI

cleaved Caspase 3 (Alexa488)

Abbildung 14: Apoptosefärbung mit einem Antikörper gegen cleaved Caspase 3. 10x Vergrößerung. Keine Färbung mit cleaved Caspase 3 (grün), DAPI Färbung (blau).

4.6 Ergebnisse Metabolomics

Um einen Überblick über die beteiligten Metaboliten in der Linse bei der Entstehung von strahleninduzierten Katarakten zu bekommen, wurde eine metabolische Analyse (Metabolomics) durchgeführt. Diese soll Hinweise über Veränderungen im Metabolismus in der Linse aufgrund von Strahlung geben. Ebenso wurde das Plasma derselben Individuen untersucht, um dort strahlungsabhängige Veränderungen zu sehen, aber auch, um zu überprüfen, ob die Veränderungen in der Linse auch in den Metaboliten im Plasma zu sehen sind.

Der Einfluss des Geschlechts auf die Metaboliten-Konzentrationen ist bekannt (Soares et al., 2017), daher wurden Proben von Männchen und Weibchen jeweils getrennt analysiert.

4.6.1 Ergebnisse der Linsen

Die PCA (Hauptkomponentenanalyse; *principal component analysis*) aller Linsen zeigt, dass die Proben junger Tiere (4 h und 24 h nach Bestrahlung) und der alten Tiere (12, 18 und 24 Monate nach Bestrahlung) sich in zwei Gruppen separieren lassen (Abb. 15 und 16; jeweils für Proben weiblicher und männlicher Tiere). Eine Trennung der Gruppen in Bezug auf die Strahlendosis konnte weder bei weiblichen noch bei männlichen Proben nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass das Alter der Tiere einen größeren Einfluss auf das Metabolom der Linsen hat als der genetische Hintergrund oder die Strahlung.

Ergebnisse

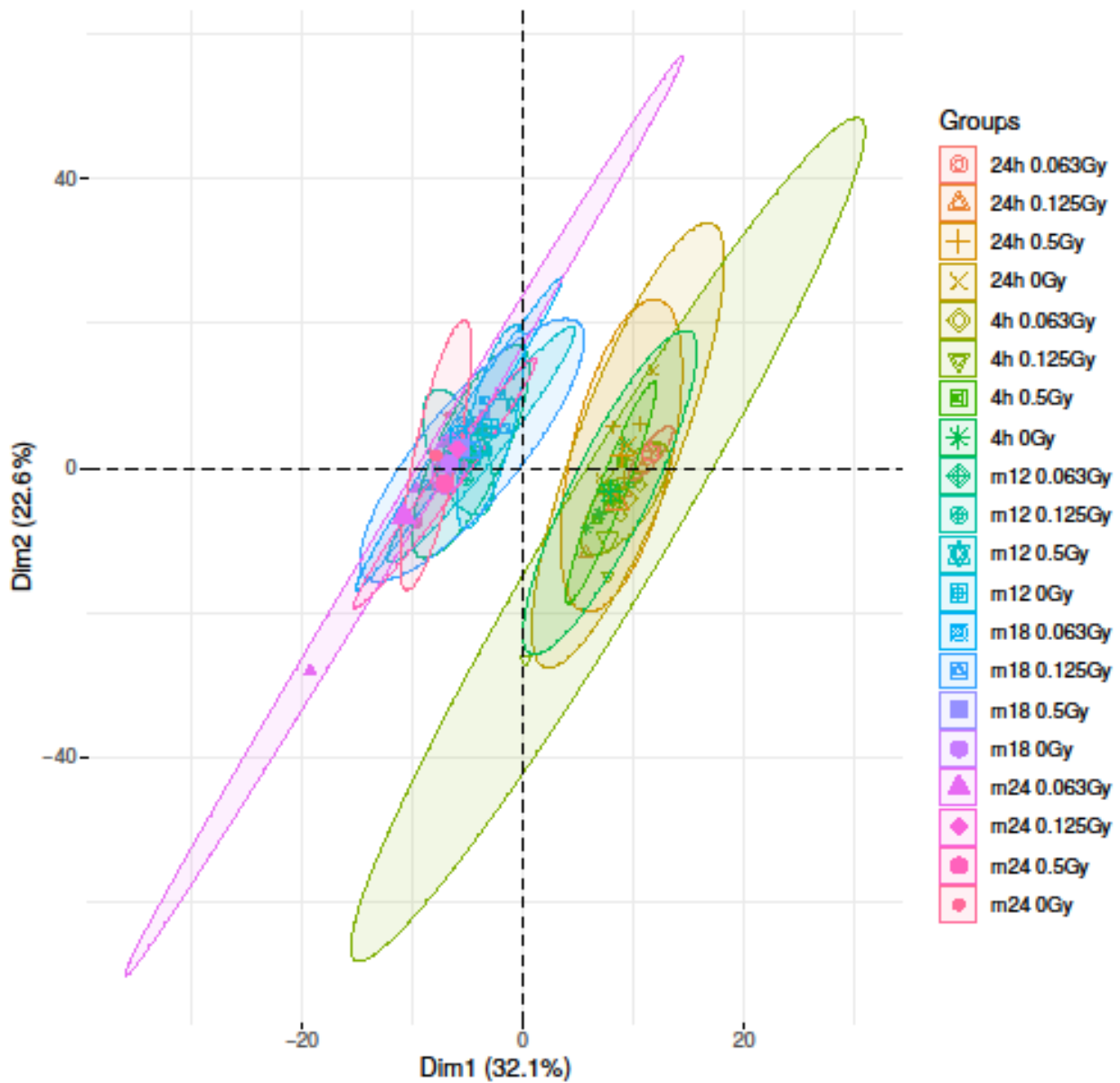


Abbildung 15: Hauptkomponentenanalyse (PCA) für Linsenproben weiblicher Tiere 4 h und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (m12, m18, m24) nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy). Die Daten von Wildtyp-Mäusen und Mutanten wurden zusammengefasst, um eine Gruppengröße von 3-4 Linsen pro Gruppe zu ermöglichen.

Ergebnisse

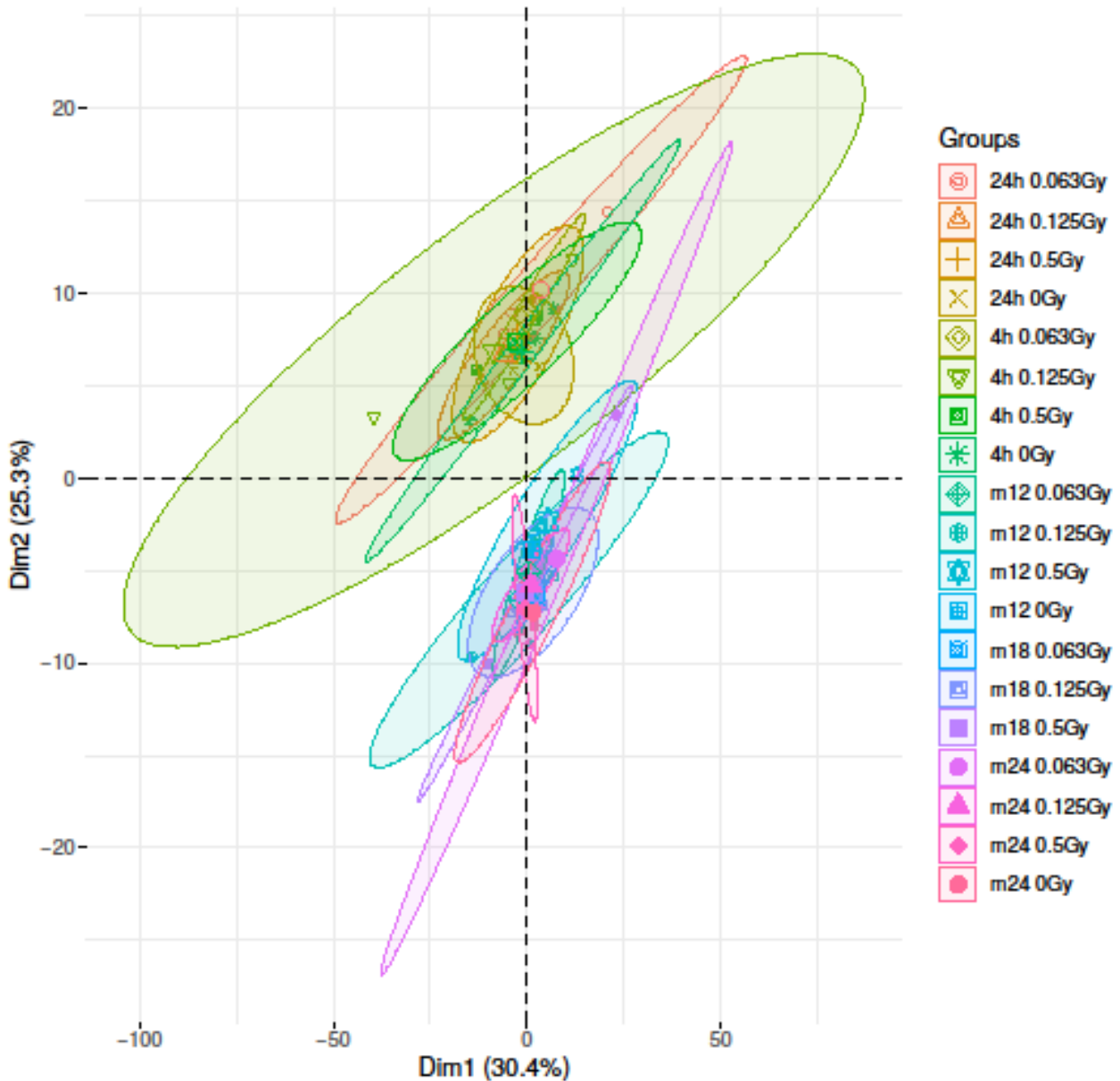


Abbildung 16: Hauptkomponentenanalyse (PCA) für Linsenproben männlicher Tiere 4 h und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (m12, m18, m24) nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy). Die Daten von Wildtyp-Mäusen und Mutanten wurden zusammengefasst, um eine Gruppengröße von 3-4 Linsen pro Gruppe zu ermöglichen. Die Gruppe von Tieren 18 Monate nach einer Bestrahlung von 0 Gy (m18 0Gy) wurde aufgrund einer zu kleinen Probenanzahl ausgeschlossen.

Für die Trennung der Gruppen waren hauptsächlich Carnitine/Acylcarnitine, Aminosäuren, biogene Amine, sowie Sphingolipide und langkettige ungesättigte Phosphatidylcholine (siehe Tabelle 11) verantwortlich.

Ergebnisse

Tabelle 11: Auflistung der Metabolite die hauptsächlich für die Trennung der Gruppen in der PCA von weiblichen und männlichen Linsen verantwortlich sind. PC aa = Phosphatidylcholindiacyl, SM = Sphingomyelin, SM (OH) = Hydroxysphingomyelin

	Linsen weiblicher Tiere		Linsen männlicher Tiere	
	hochreguliert	herunterreguliert	hochreguliert	herunterreguliert
Metaboliten	SM C26:1	Carnitine (C0)	SM C16:0	Octadecanoylcarnitine
	SM C24:1	Octadecanoylcarnitine	SM C16:1	(C18)
	SM C16:0	(C18)	SM (OH) C16:1	Methionine (Met)
	PC aa C38:3	Methionine (Met)	Tetradecanoylcarnitine	Spermidine
	SM C24:0	Propionylcarnitine (C3)	(C14)	
	PC aa C40:3	Hydroxyhexanoylcarnitine (C5-DC(6-OH))	PC aa C40:3	
	SM (OH) C22:2		SM (OH) C22:2	
	SM (OH) C16:1		SM C20:2	
			SM C24:1	
			PC aa C38:3	

Um herauszufinden, welche Signalwege der Metaboliten hauptsächlich zur Trennung der Gruppen beitragen, wurde der MetaboAnalyst Signalwegfinder benutzt. Bei Proben weiblicher Tiere waren die Signalwege „Oxidation von verzweigtkettigen Fettsäuren“ ($p = 0,0019692$) und „Beta-Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren“ ($p = 0,011125$) signifikant verändert. Die „Mitochondriale Beta-Oxidation von langkettigen gesättigten Fettsäuren“ war bei Proben beider Geschlechter betroffen (Männchen $p = 0,031185$ und Weibchen $p = 0,036322$). Allerdings sind diese statistisch signifikanten Unterschiede nach einer Korrektur für die Falsch-positiv-Rate (FPR) verschwunden.

4.6.2 Ergebnisse des Plasmas

Die Analyse der Plasmaproben ergab in Hinsicht auf die Metaboliten ein völlig anderes Ergebnis als bei den Linsen. Hier konnte in der PCA aller Plasmaproben keine unterschiedlichen Gruppen für die Bestrahlung oder das Alter identifiziert werden (Abb. 17 und 18). Somit konnten keine spezifischen Einflüsse von Metaboliten untersucht und Signalwege identifiziert werden. Dies war sowohl bei den Proben weiblicher Tiere (Abb. 17) als auch bei den Proben männlicher Tiere (Abb. 18) zu beobachten.

Weibchen

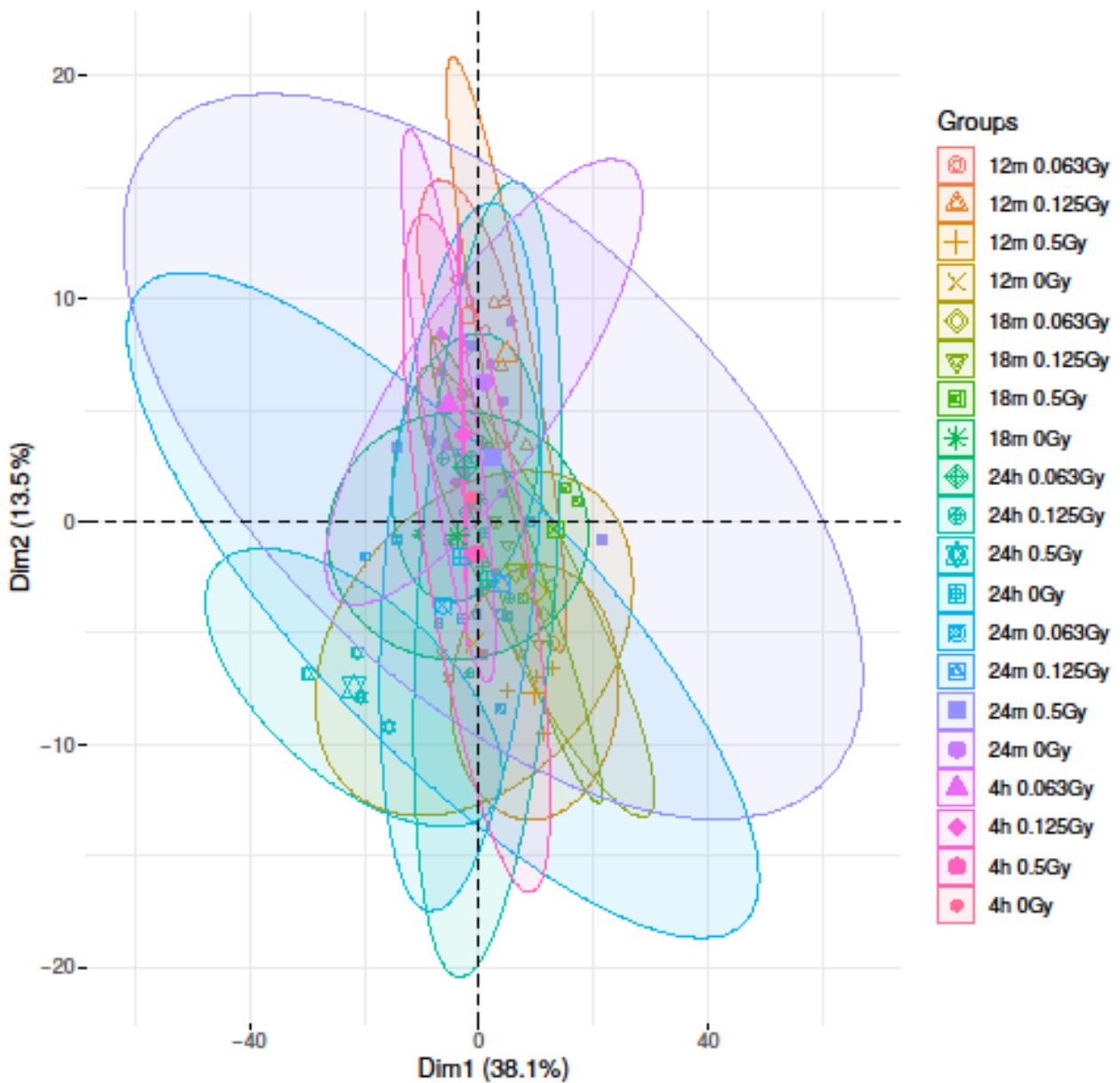


Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse für Metaboliten im Plasma weiblicher bestrahlter Tiere. Die PCA wurde für die Plasmaproben aller Zeitpunkte (4 und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (12m, 18m, 24m) nach Bestrahlung) und aller Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy) berechnet. Die Daten von Wildtyp- und Mutantenmäusen wurde zusammengefasst.

Es ist festzuhalten, dass sich die getesteten Metaboliten im Plasma beider Geschlechter nicht durch die Bestrahlung verändern. Außerdem gibt es auch keine Veränderung bei den Metaboliten im Alter, sodass kein Alterungseffekt gezeigt werden kann.

Männchen

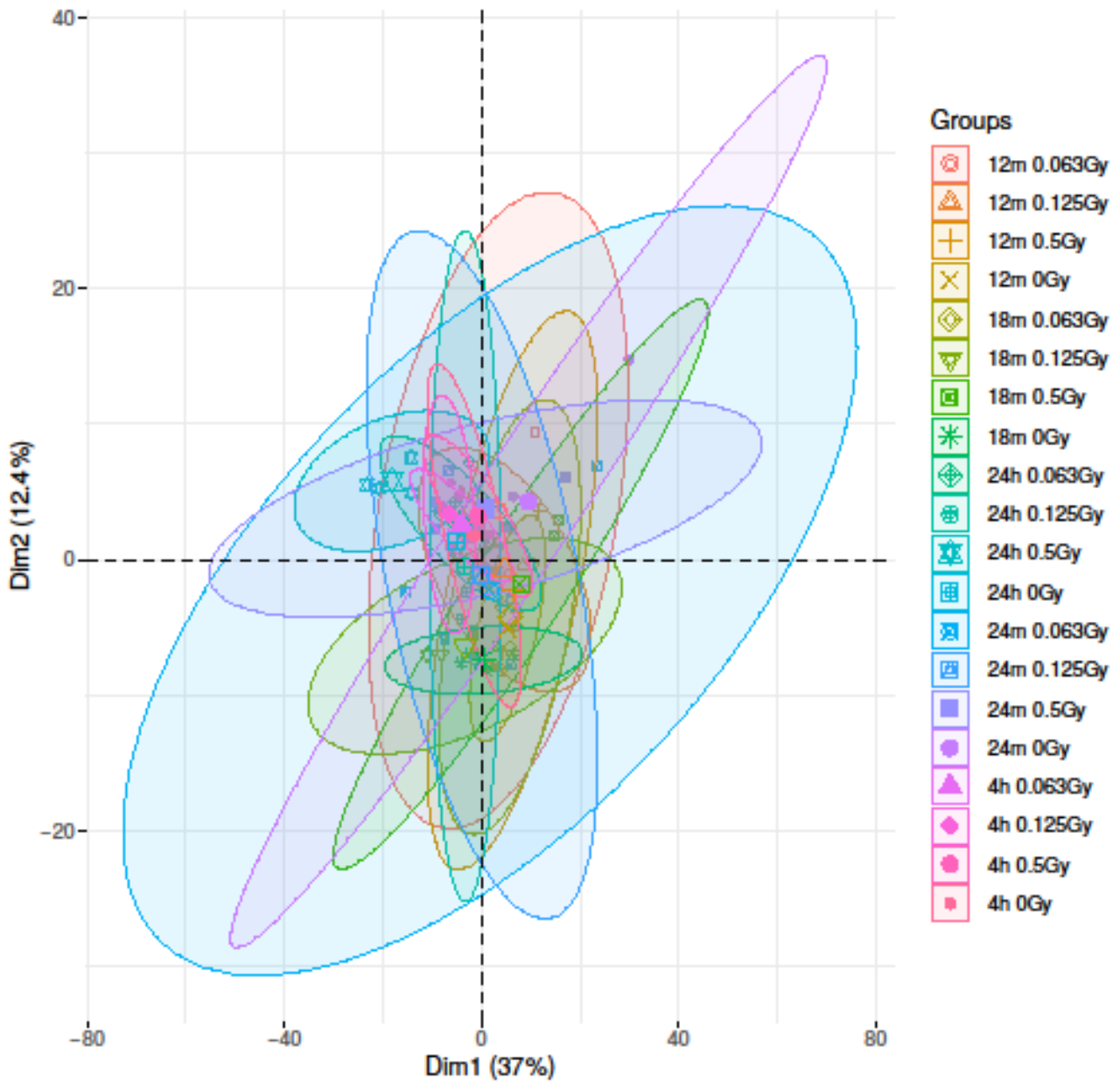


Abbildung 18: Hauptkomponentenanalyse für Metaboliten im Plasma männlicher bestrahlter Tiere. Die PCA wurde für die Plasmaproben aller Zeitpunkte (4 und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (12m, 18m, 24m) nach Bestrahlung) und aller Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy) berechnet. Die Daten von Wildtyp- und Mutantenmäusen wurde zusammengefasst.

5. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden die Auswirkungen niedriger Strahlendosen auf das Auge, insbesondere die Linse untersucht. Sie ist Teil der INSTRA-Studie, die dazu beiträgt, den Einfluss niedriger Strahlendosen auf den gesamten Körper einer Maus zu untersuchen. Für das Auge wurden histologische Untersuchungen und immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung des Strahlenschadens durchgeführt. Außerdem wurden metabolische Analysen mit Linsen und Plasma durchgeführt. Die einzelnen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten genauer diskutiert.

5.1 Posteriore Katarakte in histologischen Schnitten

Die Scheimpflug-Analysen zur Lifetime-Studie (Dalke et al., 2018) konnten eine Zunahme der Linsentrübung durch das Alter (2%) und eine Trübung durch die Strahlung (1%) in Mäusen nachweisen. Da die Scheimpflug-Technik aber unzureichend geeignet ist, um bei Mäusen den posterioren Teil der Linse zu betrachten (Pawliczek et al., 2019), waren die histologischen Schnitte von enormer Wichtigkeit, um Gewissheit über die posterior subkapsulären Katarakte (PSC) zu bekommen, da diese insbesondere als Strahlenkatarakte gelten (Ham, 1952; Cogan and Donaldson, 1952; Rehani et al., 2011).

Schon 1962 zeigten Merriam und Focht (Merriam und Focht, 1962), dass Strahlenkatarakte zunächst am posterioren Bereich entstehen, sich ausbreiten und erst dann anterior zeigen (Stage 2+). Durch das Voranschreiten der Katarakt kommt es schließlich zur vollständigen Trübung der Linse (Stage 4+). Es ist aber darauf hinzuweisen, dass diese Studien mit Dosen von 500-2000 r (Ionendosis, entspricht etwa einer Energiedosis von 0,5-19,2 Gy) und mit White Sherman Ratten durchgeführt wurden. Diese starken Formen von Katarakten können wir in unserer Studie aber ausschließen, da diese mit Scheimpflug hätten aufgedeckt werden können (Puk et al., 2013) und wir auch histologisch keine Hinweise für schwere Katarakte gefunden haben. Auch von den anterioren Katarakten (Stage 2+) können wir in unserer Studie lediglich zwei Fälle vorweisen (von 127 untersuchten Augen). Obwohl beide Fälle bei 0,5 Gy bestrahlten (weiblichen) Tieren auftraten, konnte statistisch kein eindeutiger Beweis für eine Strahlenabhängigkeit gezeigt werden (siehe Tabelle 6 in Kapitel 4.1: Subkapsuläre Katarakte 0,5 Gy als Referenz zu 0 Gy 4,74 [CI: 0,36; 61,68]). Jedoch konnte auch in beiden Fällen das zugehörige Scheimpflug-Bild bestätigen, dass anterior eine kleine Trübung vorhanden war. Diese ist natürlich in der Summe (19 Tiere pro Gruppe) dann so gering, dass ein solch kleiner Effekt in der Erfassung der ganzen Gruppe verloren geht und kein Korrelat in den Scheimpfluganalysen liefert.

Diskussion

Eindeutig hingegen ist die Auswertung der posterioren Katarakte (PSC). Dort zeigt sich eine signifikante Verbindung bei 0,5 Gy Bestrahlung und dem Auftreten von PSCs (9,28 [CI: 2,08; 41,31]). Vereinzelt treten auch PSCs bei geringerer Dosis oder Scheinbestrahlung auf, aber dies sind nur wenige Fälle. Die Erwartung war jedoch eine andere: Es wurde mit deutlichen Katarakten gerechnet, wie sie bei Kleiman et al., 2007 in der Studie zur verstärkten Kataraktentstehung bei Mäusen mit Haploinsuffizienz bei *Mrad9* und *Atm* Mutationen nach der Bestrahlung beschrieben wurden (Kleiman et al., 2007). Dort entwickelten alle doppelt heterozygoten Tiere bei einer Dosis von 0,5 Gy Stage 3+/4+ Katarakte, weshalb dieser Wert als oberste Grenze für unsere Studie verwendet wurde (Positivkontrolle). Interessant war eben einzugrenzen, ab wann eine Katarakt entsteht, da dies für geringe Dosen unter 0,5 Gy noch immer schlecht untersucht ist (Ainsbury et al., 2016; Kleiman, 2012). Ein wichtiger Unterschied zwischen unserer Studie und der von Kleiman (2007) ist, dass dort auch die Kontrollmäuse Katarakte bekommen, während bei unseren Mäusen nur eine minimale Trübung von 2 % 24 Monate nach der Bestrahlung aufgezeichnet wurde. Kleiman et al. zeigten in ihrer Studie besonders das verfrühte Auftreten von Katarakten nach Bestrahlung, nicht aber das alleinige Entstehen einer Strahlenkatarakt. Insbesondere ist zu berücksichtigen, dass die verwendete Mauslinie bei der Kleiman-Studie eine *Atm*-Mutante war, die eben aufgrund der Mutation sporadisch Katarakte ausbildet. Dennoch ist es interessant, welcher Mechanismus bei Kleiman et al. dazu geführt hat, dass durch die Bestrahlung die Katarakte deutlich früher auftraten als bei den Kontrolltieren. Möglich ist, dass aufgrund des geringeren Alters der Tiere von Kleiman et al. Diese strahlenempfindlicher waren, da diese mit 4 Wochen bestrahlt wurden und nicht wie unsere Tiere mit 10 Wochen. Dieser Faktor wäre genauer zu untersuchen, da die empfindlichste Bestrahlungsalter von Mäusen bei 2 Tagen nach der Geburt liegt (Gajewski et al., 1977).

Im Zusammenhang mit der Mauslinie, ist es auch wichtig die verwendete *Ercc2*^{+/-} Mutante nochmal aufzugreifen. Kunze et al. (2015) konnten zeigen, dass Lymphozyten von heterozygoten *Ercc2*-Mutanten eine höhere Strahlenempfindlichkeit aufweisen als der Wildtyp. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die heterozygote *Ercc2*-Mutante womöglich ebenfalls in der Linse empfindlicher gegenüber Strahlung ist, also eine frühzeitige Kataraktentwicklung nach Bestrahlung aufzeigt. Das Einsetzen der homozygoten Mutante wäre in der Lifetime-Studie jedoch nicht sinnvoll gewesen, da der Phänotyp eine cortikale Katarakt drei Wochen nach der Geburt zeigt (vgl. Kunze et al., 2015). Die erwartete Suszeptibilität gegenüber Strahlung der heterozygoten *Ercc2*-Mutante konnte aber in unserer Lebenszeit-Studie nicht gezeigt werden. Es war häufig sogar so, dass es die Anzahl der sporadischen PSCs bei Wildtypen höher lag als bei Mutanten, dies war aber statistisch nicht signifikant. Auch ein etwaiger Geschlechterunterschied war nicht deutlich, obwohl die

Diskussion

Weibchen häufiger PSCs aufwiesen als die Männchen; 18 Monate p.i. 4 von 21 Fällen bei Männchen gegen 7 Fälle von 22 Proben bei den Weibchen und 24 Monate p.i. 2 Fälle bei den Männchen (von insgesamt 21 Proben) gegen 4 Fälle bei den Weibchen (von 20 Proben). Ein Grund, warum dies nicht statistisch signifikant war, kann die vergleichsweise kleine Probenanzahl von 2-3 Tieren pro Gruppe sein und die vielen Variablen (Alter, Geschlecht, Genotyp). Es ist aber immerhin die Tendenz sichtbar, die auch den epidemiologischen Humanstudien (van Heyningen & Harding, 1986) entspricht, dass Frauen ein höheres Risiko haben an Katarakten zu erkranken als Männer, insbesondere bei der Alterskatarakt (Morgan & Schwab, 1985).

Eine große Frage wirft die starke Häufung von PSCs beim Alter 18 Monate nach Bestrahlung auf. Über die Zeit ergeben sich folgende Fallzahlen für PSCs: 12 Monate (43 Proben) 3 PSCs, 18 Monate (43 Proben) 11 PSCs und 24 Monate (41 Proben) 6 PSCs. Der Anstieg bei 18 Monaten ist sogar statistisch signifikant (46,52 [CI: 2,61; 829,14]). Rein biologisch gesehen ist dieser Anstieg schwer zu begründen, da die Katarakte mit zunehmendem Alter nicht verschwinden, sondern eher zunehmen. Ein Grund für diese Zahlen kann auch hier wieder die geringe Probenanzahl sein, sodass kein realistisches Bild der Ist-Situation wiedergespiegelt werden kann, sondern nur ein Teilbild abgezeichnet werden kann. Hinzu kommt, dass 50 % der 24 Monats-Kohorte vor Versuchsende bereits verstorben waren (Dalke et al., 2018), sodass die überlebenden Tiere nur noch einen kleinen, möglicherweise strahlenresistenteren, Teil repräsentieren. Durch diese „Selektion“ kann es zu einem verzerrten Bild gekommen sein. Tatsächlich waren Tumore eine häufige Todesursache bei 0,5 Gy bestrahlten Tieren, die auch statistisch signifikant war (vgl. Dalke et al., 2018). Es wäre durchaus möglich, dass die strahlenempfindlicheren (früher verstorbenen) Tiere auch PSCs hatten, die aufgrund des Ausscheidens der Tiere statistisch nicht erfasst werden konnten.

Obwohl PSCs als Strahlenkatarakte bekannt sind, wurde in früheren Arbeiten stets eine Progression zur vollständigen Trübungen der Linse bei Ratten beschrieben (Merriam & Focht, 1962, Merriam & Worgul, 1983). Dort wurden zunächst posteriore Vakuolen in der Linse beschrieben, die sich dann anterior ausbreiten und schließlich nach und nach die gesamte Linse trüben, sodass am Ende eine sehr starke Katarakt vorliegt (Stufe 4+). Obwohl wir Mäuse bis 24 Monate nach der Bestrahlung im Alter von 10 Wochen untersucht haben, konnten wir keine vergleichbare Progression der Katarakte beobachten. Die meisten befundeten Katarakte sind der Stufe 1+ zuzuordnen, nur einzelne Fälle, bei denen posterior und anterior eine Trübung auftrat, könnten möglicherweise als Stufe 2+ klassifiziert werden. Anteriore Katarakte konnten nur in Einzelfällen gezeigt werden, weshalb ein signifikanter Zusammenhang mit der Strahlung nicht zustande kam. Jedoch waren diese in den meisten Fällen

Diskussion

parallel im Auftreten von posterioren Katarakten bei 0,5 Gy bestrahlten Tieren. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die anterioren Katarakte möglicherweise ein Fortschreiten der posterioren Trübung sein könnten. Dieser Zusammenhang müsste aber in einer Folgestudie mit höheren Dosen genauer aufgeklärt werden, da in dieser Studie die Korrelation nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Aufgrund des Alters der Tiere am Ende ihrer Lebenserwartung ist hier nicht davon auszugehen, dass ein Fortschreiten der Katarakt bis zur vollständigen Trübung der Linse erfolgt wäre. Es bleibt lediglich bei der Beobachtung von signifikant vorkommenden PSCs aufgrund der Dosis von 0,5 Gy. Altersbezogen ergibt sich für 18 und 24 Monate ein statistisch signifikanter Zusammenhang nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy (vgl. Tabelle 8 in Kapitel 4.1.5).

Dieser klare Zusammenhang zwischen einer Bestrahlung von 0,5 und PSCs ist die erste durch Forschung basierte Bestätigung für den Schwellenwert von 0,5 Gy, der von der ICRP 2012 empfohlen wurde (siehe ICRP Bericht 2012). Auch die Auswertung epidemiologischer Studien bei Menschen setzt den Schwellenwert zwischen 0,1 und 0,9 Gy an (Shore et al., 2010). Neriishi et al. (2012) konnten bei Auswertungen von PSC-Auftreten bei Atombomben-Überlebenden zwischen 1986 und 2005 ebenfalls einen Schwellenwert von 0,5 Gy bestätigen. Damit grenzt das Ergebnis unserer Studie diese Spanne weiter ein: Bei 0,125 Gy gibt es keinen statistischen Zusammenhang zwischen PSC und Strahlung; bei 0,5 Gy hingegen konnte das erhöhte Auftreten von PSCs signifikant bewiesen werden. Daher liegt der Schwellenwert vermutlich zwischen 0,125 und 0,5 Gy. Um die Theorie des Schwellenwerts für ein Auftreten einer Katarakt zu bestätigen, müssten weitere Forschungen in dieser Dosispanne angesetzt werden. Es ist jedoch deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen einer Dosis von 0,5 Gy und dem Auftreten von PSCs besteht. Somit sind die vorgeschriebenen Grenzen von 20 mSv/Jahr absolut berechtigt und einzuhalten.

5.2 Immunhistochemische Färbungen zeigen keine Veränderungen

5.2.1 ROS

Nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, können in der Linse Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Yamamori et al., 2012). Um dies genauer zu untersuchen, wurden Augen-Schnitte bestrahlter und unbestrahlter Tiere mit einem Antikörper gegen 8-Hydroxyguanosin (8-OHG) angefärbt. Diese Färbungen zeigten jedoch keinen Einfluss der Strahlung, dem Genotyp oder dem

Diskussion

Alter (4.2.1). Da die Entstehung von ROS kurz nach der Bestrahlung erfolgt (Leach et al., 2001), wurden die Proben 4 h nach Bestrahlung sehr genau betrachtet. Aber auch hier konnte gegenüber der Kontrolle (0 Gy) bei der höchsten Dosis von 0,5 Gy kein Unterschied in der Verteilung von 8-OHG in der Linse gezeigt werden. Dies gilt sowohl für den Wildtyp als auch für die *Ercc2^{+/-}* Mutante.

Dies lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Entweder hat die Färbung in der Linse nicht ausreichend funktioniert oder es sind keine ROS 4 h nach der Bestrahlung geblieben. Die Färbung von 8-OHG in der Linse hat sich im Gegensatz zu der Färbung in der Retina als besonders schwierig erwiesen. Während in der Retina auch bei unbestrahlten Tieren deutlich die Zellkerne der inneren Körnerschicht angefärbt sind, kann man in der Linse nur bei wenigen Zellkernen eine Färbung mit 8-OHG sehen. Hinzu kommt, dass eine starke Hintergrundfärbung der Membranen der Faserzellen zu verzeichnen ist, sowie Strukturen im Cytoplasma der Faserzellen. Laut Herstellerangaben (Alpha Diagnostics) kann der Antikörper aber auch ROS-veränderte RNA und Proteine anfärben. Durch die Behandlung mit HCl während der Färbung (nach Pendergrass, 2008), sollen jedoch nur noch Veränderungen in der DNA angefärbt werden. Dies hat in der Retina auch funktioniert, da hier keine Hintergrundfärbungen sichtbar sind. In der Retina liegt aber generell eine hohe Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies vor (Trick und Berkowitz, 2005), denn auch hier kann nach der Bestrahlung keine vermehrte Markierung von 8-OHG festgestellt werden. Möglich ist auch eine unterschiedliche Fixierung der Gewebe, da die Linse im Augeninneren liegt und deutlich härter ist als die Retina, wodurch es zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Fixierung und somit der Anfärbbarkeit mit Fluoreszenzfarbstoffen kommen kann (Gottlieb et al., 1997).

Die Möglichkeit, dass die Dosen bis 0,5 Gy keine ROS in der Linse induzieren, ist durchaus möglich. Zwar wurde bereits bei Dosen über 0,5 Gy gezeigt, dass ROS in der Linse induziert wird (Bahia et al., 2018), jedoch sind die Bedingungen anders als bei unserem Experiment. Die Interpretation der Daten ist aufgrund der schlechten Färberegebnisse in der Linse jedoch schwierig.

5.2.2 Linsendifferenzierung

Um den Einfluss der Strahlung auf die Linsendifferenzierung zu untersuchen, wurden immunhistochemisch angefärbte Augen-Schnitte von bestrahlten Tieren mit Kontrollen verglichen. Der verwendete Antikörper detektiert Epitope von DNaseII β , die bei der Differenzierung der Linsenfasern beteiligt ist (Bassnett, 2009). Hier wurden ebenfalls die Dosen 0,063 Gy, 0,125 Gy und 0,5 Gy untersucht, an männlichen Wildtypen und *Ercc2^{+/-}* Mutanten. Die Färberegebnisse waren sehr schwach (4.2.2) und lassen daher kaum Raum zur Interpretation, insbesondere da DNaseII β im

Diskussion

normalen Differenzierungsprozess der Linsenfaserzellen immer in der Linse nachzuweisen ist, kann aufgrund der fehlenden Anfärbung keine Aussage getroffen werden.

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Strahlung mit der zunehmenden Dosis die Differenzierung der Linsenfaserzellen beeinträchtigt und zur Störung der geordneten Struktur im Linsenbogenbereich führt, wodurch es später zu Katarakten kommen könnte. Jedoch sind bei sämtlichen angefärbten Schnitten mit DAPI die Zellkerne im Linsenbogen ausgebildet und weisen auf keine Abweichungen aufgrund der Strahlung hin. Es ist auch nicht zum Fehlen des Kernabbaus im Übergangsbereich zur Organell-freien Zone (OFZ) gekommen, da keine intakten Zellkerne in diesem Bereich gezeigt werden konnten.

Zu den schlechten Färbeergebnissen kann u.a. die Einbettung in Kunststoff geführt haben, da Schnitte in Paraffin-eingebetteten Augen mit den gleichen Antikörpern zu guten Färbeergebnissen geführt haben (interne Ergebnisse der AG Graw).

5.2.3 Proliferation

Strahlung kann die Proliferation in den Linsenepithelzellen beeinträchtigen (Markiewicz, 2015). Um das genauer zu untersuchen, wurden Augen-Schnitte der bestrahlten Mäuse mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt. Dies sollte Hinweise darauf geben, ob eine verstärkte oder reduzierte Proliferationsaktivität in den Linsenepithelzellen auftritt. Als teilungsaktive Zone im Linsenepithel wird die germinative Zone genannt, wo die Proliferation am stärksten ist (Hanna & O'Brien, 1963; Wiley et al., 2010).

Die Anfärbung mit Ki67 zeigte jedoch auf den Plastikschnitten eine andere Verteilung als in der Literatur beschrieben. Hier wurde das gesamte Linsenepithel positiv für Ki67 angefärbt, mit abnehmender Tendenz zum Linsenbogen hin (vgl. 4.2.3). Dabei war kein Unterschied zwischen den Genotypen, dem Zeitpunkt oder der Bestrahlung festzumachen. Dieses unerwartete Ergebnis wurde versucht in Paraffin-eingebetteten Augen zu reproduzieren, jedoch wurden dort nur 1-2 Zellen in der germinativen Zone angefärbt, was somit der Literatur entspricht (Hanna & O'Brien, 1963). Auch hier kann wieder davon ausgegangen werden, dass die Kunststoffeinbettung Einfluss auf das Färbeergebnis hat. Somit ist die gleichmäßige Färbung des Linsenepithels vermutlich unspezifisch, was durch persönliche Korrespondenz mit Dr. Ohlmann (Augenklinik München) und Dr. Quinlan (Durham University, UK) bestätigt wurde. Beide Wissenschaftler nehmen an, dass die Färbung unspezifisch ist. Dies wird insbesondere dadurch bestärkt, dass die Ergebnisse in Paraffin-eingebetteten Augen deutlich abweichen. Somit kann hier auch keine Aussage über die

Auswirkungen der Strahlung auf die Proliferation getroffen werden.

5.3 Auswirkungen von niedrigen Strahlendosen auf Linsen in Organkultur

Die Linse gilt als besonders strahlenempfindlich (Ainsbury et al., 2016) und um die Auswirkungen der Strahlung auf die Linse im Detail zu untersuchen, wurden Linsen in Organkultur bestrahlt und anschließend nach 1 h, 4 h und 24 h fixiert. Färbungen mit Antikörpern gegen γ H2AX und 53BP1 sollten Doppelstrangbrüche sichtbar machen.

Das Hauptergebnis der Linsen in Organkultur ist, dass sie kein zuverlässiges Modell bietet, um Strahlenschäden zu untersuchen. Vielmehr ist die einheitliche Einfärbung des Linsenepithels mit γ H2AX ein Hinweis darauf, dass die Linsenorgankultur beschädigt ist und die DNA bereits im Linsenepithel fragmentiert wird. Eine Apoptose-Färbung mit *cleaved Caspase 3* war zwar negativ, ist aber kein Beweis dafür, dass die Zellen intakt waren.

γ H2AX ist beim Differenzierungsprozess der Linsen beteiligt (Kunze et al., 2015), liegt jedoch bei der normalen Entwicklung der Linsenfasern in der Übergangszone zur Organell-freien Zone vor und nicht im Linsenepithel. Neben ungünstigen Organkulturbedingungen können auch Beschädigungen bei der Präparation der Linsen für die möglicherweise unzureichende Funktionsfähigkeit der kultivierten Linse verantwortlich sein. Da auch die Kontrollen das gleiche Färbergebnis mit γ H2AX zeigen, ist ein Zusammenhang mit der Bestrahlung auszuschließen. Somit kann auch keine Aussage über den zeitlichen Verlauf in der Entstehung von Doppelstrangbrüchen nach der Bestrahlung getroffen werden.

Die Färbung mit einem Antikörper gegen 53BP1 zeigt überwiegend eine Kollokalisierung mit γ H2AX, generell aber nur eine geringe Anzahl von positiven Zellen (vgl. Tabelle 10). Besonders erstaunlich ist die Färbung im Linsenbogen, der Zellkerne, die sich im Abbau befinden. Es scheint als spiele 53BP1 auch hier eine Rolle, was bisher noch nicht bekannt ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Linsen in der Organkultur anders reagieren als im Tier und bieten damit unter diesen Versuchsbedingungen keinen Ersatz zum Tierversuch. Die Hypothese war, dass die Induktion von Doppelstrangbrüchen in den einzelnen Modellen gleichermaßen abläuft und die Organkultur so eine gute Möglichkeit bietet, die Auswirkungen von Strahlung auf die Linse im Detail zu untersuchen.

Generell ist es jedoch möglich Linsen in Organkultur zu halten, wie zahlreiche Publikationen zeigen (Chandorkar et al., 1981; Sivak et al., 1994; Zigler et al., 2003; Azzam et al., 2004).

5.6 Metabolomik-Analysen zeigen Alterungseffekt in Linsen und keinen Unterschied im Plasma

Die Analyse des Metaboloms erfolgte um mögliche strahleninduzierte Veränderungen in der Linse festzustellen. Es konnte aber kein Strahleneffekt nachgewiesen werden. Allerdings war es möglich einen Alterungseffekt zu zeigen (siehe PCA Abb. 15 und 16 in Kapitel 4.6). Die Linsen der 10 Wochen alten Tiere (4 h und 24 h nach Bestrahlung), zeigten einen deutlichen Unterschied zu den älteren Linsen (12, 18 und 24 Monate nach der Bestrahlung). Auch in anderen Studien konnte schon gezeigt werden, dass sich die Metabolite in Linsen von jungen und alten Tieren unterscheiden. Wang et al. (2018) zeigten, dass Linsen von jungen Tieren (6 Wochen) und alten Tieren (73 Wochen) in C57BL/6J-Mäusen abweichende Metabolitenlevel aufwiesen. Ein Vergleich der Metaboliten dieser Studien mit unseren Ergebnissen ist nicht möglich, da durch die Verwendung verschiedener Methoden jeweils unterschiedliche Metaboliten detektiert werden konnten. Die Studien von Wang et al. (2018) konnten vor allem bei gealterten Linsen einen Anstieg von Taurin erkennen, welches in dem hier verwendeten Kit nicht gemessen wurde.

Bei den Plasmaproben konnte weder ein Strahleneffekt noch ein Alterungseffekt gezeigt werden (siehe PCA Abb. 17 und 18 in Kapitel 4.6). Dies ist nicht nur überraschend im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Linsen, sondern steht auch im Kontrast zu bisherigen Ergebnissen (Houtkooper et al., 2011; Tomás-Loba et al., 2013). Dort konnte gezeigt werden, dass sich im Plasma von 24-Wochen alten Mäusen (C57BL/6J) und 103-Wochen alten Tieren deutliche Unterschiede in den Metaboliten zeigten. Vor allem einige Lipide und Aminosäuren waren signifikant unterschiedlich. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann die verwendete Gruppengröße sein. In den Experimenten von Houtkooper et al. wurden pro Altersgruppe jeweils 9 Proben eingesetzt, bei unseren Experimenten nur 4 Proben. Dies kann bedingen, dass kleine Unterschiede nicht detektierbar waren. Eine weitere Studie (Tomás-Loba et al., 2013) zeigte Unterschiede bei Phospholipiden und dem Verhältnis einiger Phospholipide im Alterungsprozess. Die Altersspanne betrug 8-129 Wochen und die Probenanzahl lag zwischen 18 und 35. Auch hier sind möglicherweise wieder die kleine Probenanzahl und die hohe Varianz der Daten aus unserer Studie die Ursache, warum die Unterschiede nicht gefunden werden konnten.

In Serumproben von C57BL/6J Tieren konnten signifikante Unterschiede bei einigen Glycerophospholipiden gezeigt werden (Kim et al., 2014). Dort wurden Tiere mit 4 Monaten gegen

Diskussion

Tiere mit 21 Monaten verglichen. Allerdings gibt es keinen Hinweis auf die verwendete Probenanzahl, daher ist ein Vergleich mit unserer Studie schwierig.

Außer der Gruppengröße gibt es weitere Faktoren, die die Metabolitenlevel beeinflussen können. Zum einen spielt der Zeitpunkt, wann Blut entnommen wird eine Rolle (Minami et al., 2009), aber auch welches Anästhetikum verwendet wird beeinflusst das Ergebnis einer Metabolitenmessung (Overmyer et al., 2015). Außerdem können Haltung und Zucht Einfluss auf die Metaboliten nehmen, sowie der Transport zur Versuchsstätte oder auch das Probenentnehmen von unterschiedlichen Personen. Durch diese vielen Faktoren, die Einfluss auf die Metaboliten haben können, ist es besonders wichtig eine ausreichend große Probenanzahl zu verwenden, um die Varianz zu minimieren.

Ausblick

Die zu Grunde liegende Arbeit bietet die Möglichkeit zur genaueren Untersuchung der Fragestellung, ob das Dosislimit von 0,5 Gy für die Augenlinse gerechtfertigt ist, um Katarakte zu vermeiden. Im Folgenden werden einige Erkenntnisse aus dieser Studie genauer besprochen.

Durch die INSTRA-Studie konnte gezeigt werden, dass es durch eine ionisierende Strahlung von 0,5 Gy bei den verwendeten Mäusen zu einem signifikanten Vorkommen von posterior subkapsulären Katarakten (PSC) kommt. Das Studiendesign konnte zwar zeigen, dass das Vorkommen von PSCs nach einer Bestrahlung von 0,125 Gy nicht signifikant ist, jedoch ist die Spanne bis zu 0,5 Gy ein vierfaches. Deshalb wäre es denkbar in einer Folgestudie die Grenze für das Auftreten von PSCs weiter einzuschränken. Man könnte hier beispielsweise in 100 mGy Schritten von 0,1 Gy bis 0,5 Gy die Grenze bei 0,5 verifizieren oder eventuell eben herabsetzen. Das würde zwei Gruppen mehr als zuvor bedeuten, jedoch wäre der Nutzen für den Strahlenschutz von enormer Bedeutung. Es würde auch die Frage beantworten, ob 0,5 Gy ein Schwellenwert für die Kataraktentstehung darstellt oder ob es ein lineares Modell zur Dosis-Wirkung gibt. Allerdings wird die Bestätigung der 0,5 Gy Grenze als Limit für die Augenlinse insbesondere im Strahlenschutz sehr viel Aufmerksamkeit erregen, da bisher nie ein so klares Ergebnis für das Auftreten von PSCs aufgrund niedriger Strahlendosen erzielt werden konnte (Ainsbury et al., 2016). Durch die Bestätigung des festgelegten Grenzwertes von 0,5 Gy ist außerdem klar, dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht. 0,5 Gy bietet nach unseren Ergebnissen eben keinen Schutz vor posterior subkapsulären Katarakten. Die Grenze muss also neu definiert werden. Dies wird gesellschaftliche und politische Folgen haben.

Da die immunhistochemischen Färbungen Probleme bereiteten, wäre in einem Folgeprojekt unbedingt daran zu denken, ein Einbettmedium zu wählen, das bewährter ist, wie z.B. Paraffin. Für histologische Untersuchungen kann man sicherlich bei Technovit 8100® bleiben, aber für immunhistochemische Analysen wäre ein zuverlässiges Färbeergebnis wünschenswert. Da die bisherigen Antikörper (8-OHG, DNaseII β , Ki67) keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung durch die Bestrahlung aufwiesen, wären Alternativen nötig oder eine Etablierung auf Paraffin-Schnitten. Antikörper gegen γ H2AX und 53BP1, die auf den Plastikschnitten nicht funktioniert haben, wären gute Kandidaten, um DNA-Schäden durch die Bestrahlung aufzudecken. Vorhandene PSCs wären genauer zu untersuchen, insbesondere der Zell-Zell-Kontakt durch Antikörper gegen Aquaporine und Connexine, aber auch Cadherine wie E- und N-Cadherin wären zu untersuchen. Dadurch könnte

Ausblick

einen Einblick in die zelluläre Struktur bei der Kataraktentstehung gewonnen werden und geklärt werden, ob die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte ein Faktor für die Progression der Katarakte ist. Ein besonderes Augenmerk wäre auf die Vakuolen im posterioren Bereich zu legen. Bisher ist unklar, warum die Zellen ihre Struktur verlieren (Aktin, Collagen), aber auch was sich im Innenraum befindet. Dazu könnte man sicher Kristalline anfärben, um zu sehen, ob diese noch intakt sind. Dadurch könnte man vielleicht auch klären, ob in den Hohlräumen gelöste Proteine oder Wasser vorhanden sind.

Die Kristalline, besonders das α -Kristallin, wäre auch im Hinblick auf seine Funktion als Hitzeschock-Protein interessant (Ganea, 2001). Eventuell lässt sich damit auch zellulärer Stress zeigen. Zu bedenken wäre hier allerdings, dass es in Linsenfaserzellen sowieso sehr stark exprimiert vorliegt (Horwitz, 2003). Eventuell wäre hier eine Linsenepithelzellkultur von Nutzen.

Die Linsenepithelzellkultur wäre auch ein guter Ansatz, um die Reparatur nach der Bestrahlung genauer zu untersuchen. Mit dem γ H2AX/53BP1-Foci-Assay könnte der Reparaturprozess über die Entstehung und das Verschwinden von Doppelstrangbrüchen (DSB) in einem zeitlichen Verlauf gezeigt werden. Dazu könnte man mittels ChIP-Sequenzierung (*Chromatin Immunoprecipitation DNA-Sequencing*) Auskunft über eventuelle Mutationen bekommen, aber auch einen Hinweis, an welchen Stellen Doppelstrangbrüche entstehen. Dadurch könnten Kandidaten-Gene identifiziert werden, die vielleicht auch die Frage klären, warum in der Linse Katarakte als Reaktion auf Bestrahlung folgen. Diese Informationen könnten Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen bieten. Der Alterungseffekt bei den Metabolom-Analysen der Linsen ist ein deutliches Ergebnis und zeigt, dass Metabolom-Untersuchungen an Linsen im zeitlichen Verlauf schwierig sind. Hier wäre es denkbar, Tiere gleichen Alters zu bestrahlen und nur einem Zeitpunkt zu untersuchen. Eine Alternative wäre es, die Dosen so hoch zu setzen, dass der Alterungseffekt überlagert wird. Genrell ist es für Metabolom-Analysen unbedingt erforderlich eine ausreichend große Probenanzahl vorzuweisen, um etwaige Unterschiede überhaupt aufzeigen zu können. Da diese Studie explorativ war, gibt es viele Ansätze um die Strahleneffekte auf die Linse weiter zu untersuchen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung	Bildbeschriftung
1	Schematische Darstellung der Linse mit der anterioren Einzelzellschicht aus Linsenepithelzellen, der Linsenbogenregion (lens bow) und den ausdifferenzierten Faserzellen ohne Zellorganellen. Es wird auch die germinative Zone und die Übergangzone (transition zone) gezeigt, in der die Zellen migrieren und dann zur Linsenmitte elongieren. Nach: Kate L. Moreau and Jonathan A. King "Protein Misfolding and Aggregation in Cataract Disease and Prospects for Prevention" Trends Mol Med. 2012
2	Die Progression von einer posterior subkapsulären Katarakt zu einer vollständig trüben Linse (Bilder 3-6 aus Merriam & Focht, 1962)
3	Vergleich der homozygoten Ercc2-Mutante (hom) mit der heterozygoten Ercc2-Mutante (het) und dem Wildtyp (WTt) im Alter von 9 Monaten.
4	Schematische Darstellung vom Einbetten der Linsen in Paraffin
5	Histologie 4 h nach Bestrahlung dient als Normalbefund; Wildtyp (WT) und Mutante (Ercc2 ^{+/-}) von männlichen Proben im Vergleich jeweils unbestrahlt, mit 0 Gy, 0,063 Gy, 0,125 Gy und 0,5 Gy bestrahlt. Morphologisch ist zwischen den Gruppen kein Unterschied zu erkennen. Größenbalken 0,5 mm. Diese Beispiele dienen zur Illustration der 2-3 untersuchten Proben.
6	Übersicht über histologischen Veränderungen der Linse im a) anterioren Bereich, b) Linsenbogen und c) posterioren Bereich. Es sind jeweils die Veränderungen im Vergleich zu einem histologischen Schnitt ohne Befund dargestellt. Die untersuchten Kriterien waren vergrößerte/geschwollene Faserzellen, Ablösungen, ASC, delokalisierte Zellkerne, Risse, PSC. Der Größenbalken entspricht 50 µm
7	Beispielbild für die Beobachtung "zwei Zentren" in der Linsenmitte. Es scheint als ob im Nucleus zwei Zentren bestehen, um die sich die Linsenfaserzellen anordnen. Dieses Phänomen trat zufällig verteilt auf und lässt sich keinem Merkmal (Geschlecht, Genotyp oder Strahlendosis) zuordnen.
8	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen 8-OHG zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Beispielhaft gezeigt an einem Wildtyp (WT) und einer Mutante (Ercc2 ^{+/-}) in 60-facher Vergrößerung. Vergleich zwischen 0 Gy und 0.5 Gy nach 4 h. Die spezifische Färbung in den Zellkernen (blau) ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Größenbalken entspricht 20 µm
9	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen 8-OHG zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Beispielhafte Anfärbung eines Auges eines bestrahlten Tieres 24 M nach Bestrahlung mit 63 mGy in 20facher und 60facher Vergrößerung mit 8-OHG (rot), gegengefärbt mit DAPI (blau).
10	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen DNaseIIβ zur Übersicht des Linsenfaser-Differenzierungs-Prozesses. Vergleich von Schnitten mit 0 Gy und 0.5 Gy 4 h nach der Bestrahlung von Wildtypen (WT) und Mutante (Ercc2 ^{+/-}). Gegenfärbung Zellkerne DAPI (blau). Größenbalken 20 µm.
11	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67 zur Bestimmung der Proliferationsaktivität. Übersichtsbild (10x) zeigt schematisch wo 40x Vergrößerungen aufgenommen wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass die Färbung im ersten Abschnitt sehr gering ist. Im zweiten und dritten Bild ist die Färbung gleichmäßig über das Linsenepithel verteilt. Größenbalken 10x 100 µm, 40x 10 µm.
12	Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki67 zur Bestimmung der Proliferationsaktivität 4 h nach Bestrahlung. Es ist beispielhaft ein unbestrahlter Wildtyp gegen eine 0,5 Gy bestrahlte Mutante aufgezeigt. Die Farbverteilung ist bei beiden Genotypen und Strahlendosen vergleichbar und weist keine Unterschiede auf. Größenbalken 10 µm.

Abbildungsverzeichnis

13	Schnitt einer Linse aus der Organkultur 4 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX (rot) und 53BP1 (grün) gefärbt, kolokalisierte Foci ergeben eine gelbe Färbung. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau), Vergrößerung 10x.
14	Apoptosefärbung mit einem Antikörper gegen cleaved Caspase 3. 10x Vergrößerung. Keine Färbung mit cleaved Caspase 3 (grün), DAPI Färbung (blau).
15	Hauptkomponentenanalyse (PCA) für Linsenproben weiblicher Tiere 4 h und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (m12, m18, m24) nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy). Die Daten von Wildtyp-Mäusen und Mutanten wurden zusammengefasst, um eine Gruppengröße von 3-4 Linsen pro Gruppe zu ermöglichen.
16	Hauptkomponentenanalyse (PCA) für Linsenproben männlicher Tiere 4 h und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (m12, m18, m24) nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy). Die Daten von Wildtyp-Mäusen und Mutanten wurden zusammengefasst, um eine Gruppengröße von 3-4 Linsen pro Gruppe zu ermöglichen. Die Gruppe von Tieren 18 Monate nach einer Bestrahlung von 0 Gy (m18 0Gy) wurde aufgrund einer zu kleinen Probenanzahl ausgeschlossen.
17	Hauptkomponentenanalyse für Metaboliten im Plasma weiblicher bestrahlter Tiere. Die PCA wurde für die Plasmaproben aller Zeitpunkte (4 und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (12m, 18m, 24m) nach Bestrahlung) und aller Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy) berechnet. Die Daten von Wildtyp- und Mutantenmäusen wurde zusammengefasst.
18	Hauptkomponentenanalyse für Metaboliten im Plasma männlicher bestrahlter Tiere. Die PCA wurde für die Plasmaproben aller Zeitpunkte (4 und 24 h, sowie 12, 18 und 24 Monate (12m, 18m, 24m) nach Bestrahlung) und aller Dosen (0; 0,063; 0,125 und 0,5 Gy) berechnet. Die Daten von Wildtyp- und Mutantenmäusen wurde zusammengefasst.

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis:

Tabelle	Beschriftung
1	Färbeprotokoll verwendeter Antikörper für Färbungen auf Plastik-Schnitten
2	Zusammenfassung der histologischen Befunde 4 h nach Bestrahlung
3	Zusammenfassung der histologischen Befunde 12 Monate nach Bestrahlung
4	Zusammenfassung der histologischen Befunde 18 Monate nach Bestrahlung
5	Zusammenfassung der histologischen Befunde 24 Monate nach Bestrahlung
6	Anteriore Linse. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben
7	Linsenbereich. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben
8	Posteriore Linse. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben
9	Nucleus/andere Beobachtungen. Aufgelistet ist das Chancenverhältnis mit 95% Konfidenzintervall der histologischen Befunde in Abhängigkeit von Dosis, Zeitpunkt, Geschlecht und Genotyp. Statistisch signifikante Ergebnisse (5% Signifikanzniveau) sind fett hervorgehoben
10	Zusammenfassung der γ H2AX und 53BP1 gefärbten Linsenepithelzellen auf Schnitten der Linsenorgankultur
11	Auflistung der Metabolite die hauptsächlich für die Trennung der Gruppen in der PCA von weiblichen und männlichen Linsen verantwortlich sind. PC aa = Phosphatidylcholindiacyl, SM = Sphingomyelin, SM (OH) = Hydroxysphingomyelin
12	Histologische Untersuchungen im Detail mit zugehörigen Maus-IDs (4 h p.i.)
13	Histologische Untersuchungen im Detail mit zugehörigen Maus-IDs (12 M p.i.)
14	Histologische Untersuchungen im Detail mit zugehörigen Maus-IDs (18 M p.i.)
15	Histologische Untersuchungen im Detail mit zugehörigen Maus-IDs (24 M p.i.)

Quellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Abdulrahman, Wassim, et al. "ARCH domain of XPD, an anchoring platform for CAK that conditions TFIIH DNA repair and transcription activities." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.8 (2013): E633-E642.
- Adamietz, Irenäus A., and Volkmar Nicolas. "Ionisierende Strahlung." *Die ärztliche Begutachtung*. Steinkopff, 2008. 799-813.
- Ainsbury, Elizabeth A., et al. "Ionizing radiation induced cataracts: recent biological and mechanistic developments and perspectives for future research." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 770 (2016): 238-261.
- Aleta, C. R. "Regulatory implications of a linear non-threshold (LNT) dose-based risks." *Applied Radiation and isotopes* 67.7-8 (2009): 1290-1298.
- Asbell, Penny A., et al. "Age-related cataract." *The Lancet* 365.9459 (2005): 599-609.
- Azzam, Naiel, and Ahuva Dovrat. "Long-term lens organ culture system to determine age-related effects of UV irradiation on the eye lens." *Experimental eye research* 79.6 (2004): 903-911.
- Bahia, Simran, et al. "Oxidative and nitrative stress-related changes in human lens epithelial cells following exposure to X-rays." *International journal of radiation biology* 94.4 (2018): 366-373.
- Bannik, Kristina, et al. "Are mouse lens epithelial cells more sensitive to γ -irradiation than lymphocytes?." *Radiation and environmental biophysics* 52.2 (2013): 279-286.
- Bassnett, Steven. "Fiber cell denucleation in the primate lens." *Investigative ophthalmology & visual science* 38.9 (1997): 1678-1687.
- Bassnett, Steven. "On the mechanism of organelle degradation in the vertebrate lens." *Experimental eye research* 88.2 (2009): 133-139.
- Bassnett, Steven, Yanrong Shi, and Gijs FJM Vrensen. "Biological glass: structural determinants of eye lens transparency." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366.1568 (2011): 1250-1264.
- Benedek, G. B. "Theory of transparency of the eye." *Applied optics* 10.3 (1971): 459-473.
- Bermbach, Georg, Ursula Mayer, and Gottfried OH Naumann. "Human lens epithelial cells in tissue culture." *Experimental eye research* 52.2 (1991): 113-119.
- Bhagyalaxmi, S. G., et al. "Association of G> A transition in exon-1 of alpha crystallin gene in age-related cataracts." *Oman journal of ophthalmology* 3.1 (2010): 7.
- Bhagyalaxmi, S. G., et al. "A novel mutation (F71L) in α A-crystallin with defective chaperone-like function associated with age-related cataract." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1792.10 (2009): 974-981.
- Bonné, Andreas. "Kernphysik." *Gleichstromtrassen und ihre Auswirkungen*. Springer Vieweg, Wiesbaden, 2016. 25-35.
- Böck, Peter. "Methylenblau-basisches Fuchsin (Ein-Schritt-Methode)." *Der Semidünnschnitt*. JF Bergmann-Verlag, 1984. 64-65.

Quellenverzeichnis

- Bojahr, André, et al. "Praktikum der Kernphysik." (2006).
- Bouffler, Simon, et al. "Radiation-induced cataracts: the Health Protection Agency's response to the ICRP statement on tissue reactions and recommendation on the dose limit for the eye lens." *Journal of Radiological Protection* 32.4 (2012): 479.
- Bours, J., and O. Hockwin. "Charakterisierung der wasserlöslichen Proteine der Linse mittels Immunologie und Isoelektrofokussierung und ihre Beziehung zum Alterungsprozeß." *Klin Monatsbl Augenheilkd* 170 (1977): 51-59.
- Brennan, Lisa Ann, Rebecca Susan McGreal, and Marc Kantorow. "Oxidative stress defense and repair systems of the ocular lens." *Front Biosci (Elite Ed)* 4 (2012): 141-155.
- Brian, Garry, and Hugh Taylor. "Cataract blindness: challenges for the 21st century." *Bulletin of the World Health Organization* 79 (2001): 249-256.
- Brown, Nicholas Phelps. "The lens is more sensitive to radiation than we had believed." (1997): 257-257.
- Brown, N. Phelps, and Anthony J. Bron. "Lens disorders: a clinical manual of cataract diagnosis." *Ophthalmic Literature* 1.49 (1996): 64.
- Burma, Sandeep, et al. "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." *Journal of Biological Chemistry* 276.45 (2001): 42462-42467.
- Caldecott, Keith W. "XRCC1 and DNA strand break repair." *DNA repair* 2.9 (2003): 955-969.
- Celeste, Arkady, et al. "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." *Nature cell biology* 5.7 (2003): 675.
- Chandorkar, A. G., et al. "Lens organ culture." *Indian journal of ophthalmology* 29.3 (1981): 151.
- Christenberry, K. W., and J. Furth. "Induction of cataracts in mice by slow neutrons and X-rays." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 77.3 (1951): 559-560.
- Christmann, Markus, et al. "Mechanisms of human DNA repair: an update." *Toxicology* 193.1-2 (2003): 3-34.
- Chylack Jr, Leo T. "Mechanisms of senile cataract formation." *Ophthalmology* 91.6 (1984): 596-602.
- Cleaver, J. E. "Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum." *nature* 218.5142 (1968): 652.
- Cogan, D.G., and D.D. Donaldson. "Experimental radiation cataracts: I. Cataracts in the rabbit following single x-ray exposure." *AMA archives of ophthalmology* 45.5 (1951): 508-522.
- Costello, M. Joseph, et al. "Electron tomography of fiber cell cytoplasm and dense cores of multilamellar bodies from human age-related nuclear cataracts." *Experimental eye research* 101 (2012): 72-81.
- Coulombre, Jane L., and Alfred J. Coulombre. "Lens development: fiber elongation and lens orientation." *Science* 142.3598 (1963): 1489-1490.
- Dalke, Claudia, et al. "Lifetime study in mice after acute low-dose ionizing radiation: a multifactorial study with special focus on cataract risk." *Radiation and environmental biophysics* 57.2 (2018): 99-113.

Quellenverzeichnis

- Delaye, Mireille, and Annette Tardieu. "Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency." *Nature* 302.5907 (1983): 415-417.
- Dugle, D. L., C. J. Gillespie, and J. D. Chapman. "DNA strand breaks, repair, and survival in x-irradiated mammalian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73.3 (1976): 809-812.
- Elkind, M. M., and C. Kamper. "Two forms of repair of DNA in mammalian cells following irradiation." *Biophysical journal* 10.3 (1970): 237-245.
- Eshaghian, Joseph, and Barbara W. Streeten. "Human posterior subcapsular cataract: an ultrastructural study of the posteriorly migrating cells." *Archives of Ophthalmology* 98.1 (1980): 134-143.
- Gajdusek, Corinne M., et al. "Gamma radiation effect on vascular smooth muscle cells in culture." *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 36.4 (1996): 821-828.
- Gajewski, A. K., et al. "Types and rate of cataract development in mice irradiated at different ages." *Radiation research* 71.2 (1977): 471-480.
- Ganea, Elena. "Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins." *Current Protein and Peptide Science* 2.3 (2001): 205-225.
- Gerdes, J. "Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies." *Seminars in cancer biology*. Vol. 1. No. 3. 1990.
- Gilbert, S. F. "Development of the vertebrate eye." *Developmental Biology*. Sunderland, MA: Sinauer (2000): 399-403.
- Gottlieb, Eyal, et al. "Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis." *The EMBO journal* 16.6 (1997): 1381-1390.
- Gown, Allen M., and Mark C. Willingham. "Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50.4 (2002): 449-454.
- Graw, Jochen. "Kristalline: Strukturproteine der Augenlinse." *Biologie in unserer Zeit* 15.2 (1985): 33-41.
- Grunert, Jens-Holger. "Entdeckung der Röntgenstrahlen und Grundlagen der Strahlenphysik." *Strahlenschutz für Röntgendiagnostik und Computertomografie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019. 3-37.
- Ham, William T. "Radiation cataract." *AMA Archives of Ophthalmology* 50.5 (1953): 618-643.
- Hamada, Nobuyuki, et al. "Emerging issues in radiogenic cataracts and cardiovascular disease." *Journal of radiation research* 55.5 (2014): 831-846.
- Hamada, Nobuyuki. "Ionizing radiation sensitivity of the ocular lens and its dose rate dependence." *International journal of radiation biology* 93.10 (2017): 1024-1034.
- Hanna, Calvin, and James E. O'Brien. "Lens epithelial cell proliferation and migration in radiation cataracts." *Radiation research* 19.1 (1963): 1-11.
- Heisenberg, Werner. "Die Kernprozesse." *Die Physik der Atomkerne*. Vieweg+ Teubner Verlag, Wiesbaden, 1947. 107-132.

Quellenverzeichnis

- Heuck, Friedrich HW. *Forschung mit Röntgenstrahlen: Bilanz eines Jahrhunderts (1895-1995)*. Ed. Eckard Macherauch. Vol. 1. Berlin Heidelberg New York (weitere Lit: Springer, 1995).
- Horwitz, Joseph. "Alpha-crystallin." *Experimental eye research* 76.2 (2003): 145-153.
- Houtkooper, Riekelt H., et al. "The metabolic footprint of aging in mice." *Scientific reports* 1 (2011): 134.
- Ibaraki, Nobuhiro, Li-Ren Lin, and Venkat N. Reddy. "Effects of growth factors on proliferation and differentiation in human lens epithelial cells in early subculture." *Investigative ophthalmology & visual science* 36.11 (1995): 2304-2312.
- Itin, Peter H., Alain Sarasin, and Mark R. Pittelkow. "Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes." *Journal of the American Academy of Dermatology* 44.6 (2001): 891-924.
- Jaeger, Thomas. "Berechnung der Schwächung von Neutronenstrahlung." *Grundzüge der Strahlenschutz technik*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1960. 117-130.
- Jiang, Jin, et al. "Copy number variations of DNA repair genes and the age-related cataract: Jiangsu Eye Study." *Investigative ophthalmology & visual science* 54.2 (2013a): 932-938.
- Jiang, Shengqun, et al. "Polymorphisms of the WRN gene and DNA damage of peripheral lymphocytes in age-related cataract in a Han Chinese population." *Age* 35.6 (2013b): 2435-2444.
- Jose, Jule Griebrok. "The role of DNA damage, its repair and its misrepair in the etiology of cataract: a review." *Ophthalmic Research* 10.1 (1978): 52-62.
- Kiefer, Jürgen. "Akute Strahlenschäden." *Biologische Strahlenwirkung*. Birkhäuser, Basel, 1989. 331-348.
- Kim, Jeoum Nam, and Byung Mu Lee. "Risk factors, health risks, and risk management for aircraft personnel and frequent flyers." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 10.3 (2007): 223-234.
- Kimura, Samuel J., and Hiroshi Ikui. "Atomic-Bomb Radiation Cataract*: Case Report with Histopathologic Study." *American journal of ophthalmology* 34.6 (1951): 811-816.
- Kim, Seungwoo, et al. "Aging-related changes in mouse serum glycerophospholipid profiles." *Osong public health and research perspectives* 5.6 (2014): 345-350.
- Kleiman, Norman J., et al. "Mrd9 and atm haploinsufficiency enhance spontaneous and X-ray-induced cataractogenesis in mice." *Radiation research* 168.5 (2007): 567-573.
- Kleiman, Norman J. "Radiation cataract." *Annals of the ICRP* 41.3-4 (2012): 80-97.
- Kolb, Klaus, and Wolfgang Kolb. "Grundlagen der Durchstrahlung." *Grobstrukturprüfung mit Röntgen- und Gammastrahlen*. Vieweg+ Teubner Verlag, Wiesbaden, 1970. 26-51.
- Kraemer, K. H., and M. M. Lee. "J. Scotto Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases." *arch Dermatol* 123 (1987): 241-250.
- Krieger, Hanno. "Wechselwirkung von Neutronenstrahlung mit Materie." *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Vieweg+ Teubner, 2009. 228-247.

Quellenverzeichnis

- Krieger, Hanno. "Radionuklide in der Medizin." *Strahlungsquellen für Technik und Medizin*. Springer Spektrum, Wiesbaden, 2013. 407-415.
- Kunze, Sarah, et al. "New mutation in the mouse Xpd/Ercc2 gene leads to recessive cataracts." *PloS one* 10.5 (2015): e0125304.
- Laskowski, Wolfgang. *Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2019.
- Leach, J. Kevin, et al. "Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen." *Cancer research* 61.10 (2001): 3894-3901.
- Lee, Jae Eun, et al. "Relationship of cataract symptoms of preoperative patients and vision-related quality of life." *Quality of life research* 14.8 (2005): 1845-1853.
- Liao, Jiemin, et al. "Meta-analysis of genome-wide association studies in multiethnic Asians identifies two loci for age-related nuclear cataract." *Human molecular genetics* 23.22 (2014): 6119-6128.
- Liebel, Frank, et al. "Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes." *Journal of Investigative Dermatology* 132.7 (2012): 1901-1907.
- Liu, Yu-Chi, et al. "Cataracts." *The Lancet* 390.10094 (2017): 600-612.
- Luckey, Thomas D. *Radiation hormesis*. CRC press, 1991.
- Markiewicz, Ewa, et al. "Nonlinear ionizing radiation-induced changes in eye lens cell proliferation, cyclin D1 expression and lens shape." *Open biology* 5.4 (2015): 150011.
- Markova, E., N. Schultz, and I. Y. Belyaev. "Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival." *International journal of radiation biology* 83.5 (2007): 319-329.
- Matsuda, Katsuya, et al. "Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis." *Histopathology* 59.3 (2011): 441-451.
- McCarty, Catherine A., and Hugh R. Taylor. "The genetics of cataract." *Investigative ophthalmology & visual science* 42.8 (2001): 1677-1678.
- Merriam Jr, George R, and Elizabeth F. Focht. "A clinical study of radiation cataracts and the relationship to dose." *The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine* 77.5 (1957): 759-785.
- Merriam Jr, George R., and Elizabeth F. Focht. "A clinical and experimental study of the effect of single and divided doses of radiation on cataract production." *Transactions of the American Ophthalmological Society* 60 (1962): 35.
- Merriam Jr, GEORGE R., and BASIL V. Worgul. "Experimental radiation cataract--its clinical relevance." *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 59.4 (1983): 372.
- Meyer, Stefan, and Egon Schweidler. *Radioaktivität*. Springer-Verlag, 2013.
- Minami, Yoichi, et al. "Measurement of internal body time by blood metabolomics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.24 (2009): 9890-9895.

Quellenverzeichnis

- Minamoto, A., et al. "Cataract in atomic bomb survivors." *International journal of radiation biology* 80.5 (2004): 339-345.
- Morgan, Lyndon W., and Ivan R. Schwab. "Epidemiologic aspects of senile cataract extraction stratified by visual acuity, age, and sex." *American journal of ophthalmology* 100.4 (1985): 520-522.
- Munshi, Anupama, Marvette Hobbs, and Raymond E. Meyn. "Clonogenic cell survival assay." *Chemosensitivity*. Humana Press, 2005. 21-28.
- Nakashima, Eiji, Kazuo Neriishi, and Atsushi Minamoto. "A reanalysis of atomic-bomb cataract data, 2000–2002: a threshold analysis." *Health physics* 90.2 (2006): 154-160.
- Nance, Martha A., and Susan A. Berry. "Cockayne syndrome: review of 140 cases." *American journal of medical genetics* 42.1 (1992): 68-84.
- Nandrot, E., et al. "Gamma-D crystallin gene (CRYGD) mutation causes autosomal dominant congenital cerulean cataracts." *Journal of medical genetics* 40.4 (2003): 262-267.
- Neriishi, Kazuo, et al. "Radiation dose and cataract surgery incidence in atomic bomb survivors, 1986–2005." *Radiology* 265.1 (2012): 167-174.
- Norpoth, K., and H. J. Weitowitz. "Beruflich verursachte Tumoren." *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. 248-278.
- Okano, Yoshiyuki, et al. "A genetic factor for age-related cataract: identification and characterization of a novel galactokinase variant, "Osaka," in Asians." *The American Journal of Human Genetics* 68.4 (2001): 1036-1042.
- Olson, Randall J., et al. "Cataract treatment in the beginning of the 21st century." *American journal of ophthalmology* 136.1 (2003): 146-154.
- Overmyer, Katherine A., et al. "Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model." *PloS one* 10.2 (2015).
- Padma, G., et al. "Polymorphisms in two DNA repair genes (XPD and XRCC1)–association with age related cataracts." *Molecular vision* 17 (2011): 127.
- Parshad, R., et al. "Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer." *British journal of cancer* 74.1 (1996): 1-5.
- Pawliczek, Daniel, et al. "Spectral domain-Optical coherence tomography (SD-OCT) as a monitoring tool for alterations in mouse lenses." *Experimental eye research* 190 (2020): 107871.
- Pirie, Antoinette. "Color and solubility of the proteins of human cataracts." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 7.6 (1968): 634-650.
- Pfalzner, P. M. "Sievert, gray and dose equivalent." *Journal of the Canadian Association of Radiologists* 34.4 (1983): 298-300.
- Puk, Oliver, Martin Hrabě de Angelis, and Jochen Graw. "Lens density tracking in mice by Scheimpflug imaging." *Mammalian genome* 24.7-8 (2013): 295-302.
- Rabaey, M. "Lens proteins during embryonic development of different vertebrates." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 4.4 (1965): 560-578.
- Reddan, John R., et al. "Retention of lens specificity in long-term cultures of diploid rabbit lens epithelial cells." *Differentiation* 33.3 (1987): 168-174.

Quellenverzeichnis

- Rehani, Madan M., et al. "Radiation and cataract." *Radiation protection dosimetry* 147.1-2 (2011): 300-304.
- Reiser, Maximilian, Fritz-Peter Kuhn, and Jürgen Debus. *Radiologie*. Thieme, 2011.
- Rzeszowska-Wolny, Joanna, et al. "Influence of polymorphisms in DNA repair genes XPD, XRCC1 and MGMT on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes in vitro." *Radiation research* 164.2 (2005): 132-140.
- Schmiermund, Torsten. "Strahlenbelastung." *Das Chemiewissen für die Feuerwehr*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2019. 375-378.
- Schönfelder, V. "Astrophysik: Das Gammastrahlen-Observatorium GRO." *Physikalische Blätter* 47.4 (1991): 295-297.
- Schmitt, Horst P. "Strahlenphysikalische und strahlenbiologische Grundlagen." *Akute und intervalläre Strahlenschäden des Zentralnervensystems*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1979. 16-37.
- Schultz, Linda B., et al. "p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks." *The Journal of cell biology* 151.7 (2000): 1381-1390.
- Seichert, N. "Zur Problematik der Radon-Balneotherapie." *Physikalische Medizin, Rehabilitationsmedizin, Kurortmedizin* 2.05 (1992): 157-160.
- Shkarupa, V. M., et al. "Research of DNA repair genes polymorphism XRCC1 and XPD and the risks of thyroid cancer development in persons exposed to ionizing radiation after the Chernobyl disaster." *Problemy radiatsionoi medytyny ta radiobiologii* 20 (2015): 552-571.
- Shentu, Xingchao, et al. "Special fasciculiform cataract caused by a mutation in the gammaD-crystallin gene." *Mol Vis* 10.4 (2004): 233-239.
- Shiels, Alan, et al. "The EPHA2 gene is associated with cataracts linked to chromosome 1p." *Molecular vision* 14 (2008): 2042.
- Shiels, Alan, and J. Fielding Hejtmancik. "Genetic origins of cataract." *Archives of ophthalmology* 125.2 (2007): 165-173.
- Shore, Roy E., Kazuo Neriishi, and Eiji Nakashima. "Epidemiological studies of cataract risk at low to moderate radiation doses:(not) seeing is believing." *Radiation research* 174.6b (2010): 889-894.
- Sivak, J. G., K. L. Herbert, and L. Segal. "Ocular lens organ culture as a measure of ocular irritancy: the effect of surfactants." *Toxicology Methods* 4.1 (1994): 56-65.
- Soares, Ana Francisca, et al. "Sexual dimorphism in hepatic lipids is associated with the evolution of metabolic status in mice." *NMR in Biomedicine* 30.10 (2017): e3761.
- Song, Yu-Zhe, et al. "ERCC2 polymorphisms and radiation-induced adverse effects on normal tissue: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis." *Radiation Oncology* 10.1 (2015): 247.
- Spector, Abraham, et al. "The Effect of Aging on Glutathione Peroxidase-I Knockout Mice—Resistance of the Lens to Oxidative Stress." *Experimental eye research* 72.5 (2001): 533-545.
- Stafford, Scott L., et al. "Orbital lymphoma: radiotherapy outcome and complications." *Radiotherapy and Oncology* 59.2 (2001): 139-144.

Quellenverzeichnis

- Stolz, W. "Alphazerfall, Alphastrahlung." ISBN: 978-3-8085-5494-4 (Buch) ISBN: 978-3-8085-5806-5 (E-Book) *Der Titel erscheint in der Edition Harri Deutsch des Verlages Europa-Lehrmittel.*: 10 (2005)
- Stürmer, Jörg. "Katarakt–Grauer Star." *Therapeutische Umschau* 66.3 (2009): 167-171.
- Srinivasan, B. D., and C. V. Harding. "Cellular proliferation in the lens." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 4.4 (1965): 452-470.
- Su, Shu, et al. "The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age-related cataract: Jiangsu Eye Study." *Investigative ophthalmology & visual science* 54.2 (2013): 1201-1207.
- Sudprasert, Wanwisa, Panida Navasumrit, and Mathuros Ruchirawat. "Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells." *International journal of hygiene and environmental health* 209.6 (2006): 503-511.
- Takayama, Kyoko, et al. "Defects in the DNA repair and transcription gene ERCC2 (XPB) in trichothiodystrophy." *American journal of human genetics* 58.2 (1996): 263.
- Taylor, Hugh R., et al. "Effect of ultraviolet radiation on cataract formation." *New England journal of medicine* 319.22 (1988): 1429-1433.
- Thome, Christopher, et al. "Deterministic effects to the lens of the eye following ionizing radiation exposure: Is there evidence to support a reduction in threshold dose?." *Health physics* 114.3 (2018): 328-343.
- Thümmel, H-W. "Zur Energieabhängigkeit des Massenseh wäehungskoeffizienten Von Aluminium-und Gold-Absorbern für Betastrahlung." (1976): 240-247.
- Tomás-Loba, Antonia, et al. "A metabolic signature predicts biological age in mice." *Aging cell* 12.1 (2013): 93-101.
- Treton, J., S. Modak, and Y. Courtois. "DNA repair in the lens." *Ophthalmic Research* 11.5-6 (1979): 335-340.
- Trick, Gary L., and Bruce A. Berkowitz. "Retinal oxygenation response and retinopathy." *Progress in retinal and eye research* 24.2 (2005): 259-274.
- Troelstra, Christine, et al. "ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes." *Cell* 71.6 (1992): 939-953.
- Truscott, Roger JW, and Michael G. Friedrich. "The etiology of human age-related cataract. Proteins don't last forever." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1860.1 (2016): 192-198.
- van de Ven, Marieke, et al. "Effects of compound heterozygosity at the Xpd locus on cancer and ageing in mouse models." *DNA repair* 11.11 (2012): 874-883.
- Vanhavere, Filip, et al. "Measurements of eye lens doses in interventional radiology and cardiology: final results of the ORAMED project." *Radiation Measurements* 46.11 (2011): 1243-1247.
- Vano, Eliseo, et al. "Eye lens exposure to radiation in interventional suites: caution is warranted." *Radiology* 248.3 (2008): 945-953.
- Vano, Eliseo, et al. "Radiation cataract risk in interventional cardiology personnel." *Radiation research* 174.4 (2010): 490-495.

Quellenverzeichnis

- Van Heyningen, R., and J. J. Harding. "Risk factors for cataract: diabetes, myopia and sex." *Colloq. INSERM*. Vol. 147. No. 38. 1986.
- VON SALLMANN, L. U. D. W. I. G. "Experimental studies on early lens changes after roentgen irradiation: III. Effect of X-radiation on mitotic activity and nuclear fragmentation of lens epithelium in normal and cysteine-treated rabbits." *AMA archives of ophthalmology* 47.3 (1952): 305-320.
- van Venrooij, Walther J., et al. "Cultured calf lens epithelium. I. Methods of cultivation and characteristics of the cultures." *Experimental eye research* 18.6 (1974): 517-526.
- Wang, Yekai, et al. "Metabolic signature of the aging eye in mice." *Neurobiology of aging* 71 (2018): 223-233.
- Ward, J. F. "The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review." *International journal of radiation biology* 57.6 (1990): 1141-1150.
- Ward, Irene M., et al. "Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX." *Journal of Biological Chemistry* 278.22 (2003): 19579-19582.
- Weber, Christine A., et al. "ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3." *The EMBO journal* 9.5 (1990): 1437-1447.
- Weikel, Karen A., et al. "Nutritional modulation of cataract." *Nutrition reviews* 72.1 (2014): 30-47.
- Wiley, Luke A., Ying-Bo Shui, and David C. Beebe. "Visualizing lens epithelial cell proliferation in whole lenses." *Molecular vision* 16 (2010): 1253.
- Wistow, Graeme J., and Joram Piatigorsky. "Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue." *Annual review of biochemistry* 57.1 (1988): 479-504.
- Wolf, Norman, et al. "Radiation cataracts: mechanisms involved in their long delayed occurrence but then rapid progression." *Molecular vision* 14 (2008): 274.
- Worgul, Basil V., et al. "Lens epithelium and radiation cataract: I. Preliminary studies." *Archives of Ophthalmology* 94.6 (1976): 996-999.
- Yamamori, Tohru, et al. "Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint." *Free Radical Biology and Medicine* 53.2 (2012): 260-270.
- Zigler Jr, J. Samuel, et al. "Tempol-H inhibits opacification of lenses in organ culture." *Free Radical Biology and Medicine* 35.10 (2003): 1194-1202.
- Zukunft, Sven, et al. "Targeted metabolomics of dried blood spot extracts." *Chromatographia* 76.19-20 (2013): 1295-1305.

Anhang

Anhang

Tabellen 12-15 der histologischen Untersuchungen im Detail mit zugehörigen Maus-IDs

Histology 4 h p.i.	ID	Anterior				Lens bow region				Posterior				Nucleus		additional changes	
		enlarged/swollen fiber cells	detachments	small vacuoles	mislocated nuclei	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	enlarged/swollen fiber cells	small vacuoles	mislocated nuclei	fissures	Posterior Subcapsular Cataract (PSC)	fissures	mislocated nuclei	2 centers	small vacuoles	Retina	mislocated nuclei in the cortex
4h WT m sham	30309148			x													
4h WT m sham	30266830			x													
4h Mut m sham	30266846																
4h WT m 63mGy	30309132	x														x	
4h WT m 63mGy	30309133		x														
4h WT m 63mGy	30309140			x													
4h Mut m 63mGy	30309172																
4h Mut m 63mGy	30309188				x												
4h Mut m 63mGy	30309180																
4h Mut m 63mGy	30309173		x														
4h WT m 125mGy	30298493			x													
4h WT m 125mGy	30298501			x													
4h WT m 125mGy	30298494			x													
4h Mut m 125mGy	30298540		x														
4h Mut m 125mGy	30298541			x													
4h Mut m 125mGy	30298548																
4h WT m 0.5Gy	30266339																
4h WT m 0.5Gy	30266331			x													
4h Mut m 0.5Gy	30266300			x													
4h Mut m 0.5Gy	30266307			x													
4h WT f sham	30309158																
4h WT f sham	30266838		x														
4h WT f sham	30298529																
4h Mut f sham	30266854			x													
4h Mut f sham	30298576																
4h WT f 63mGy	30309160	x															
4h WT f 63mGy	30309152																
4h WT f 63mGy	30309155			x													
4h Mut f 63mGy	30309192																
4h Mut f 63mGy	30309200		x														
4h Mut f 63mGy	30309193																
4h Mut f 63mGy	30309208	x															
4h WT f 125mGy	30298525	x			x												
4h WT f 125mGy	30298518																
4h WT f 125mGy	30298517																
4h Mut f 125mGy	30298555	x															
4h Mut f 125mGy	30298564																
4h Mut f 125mGy	30298572		x														
4h WT f 0.5Gy	30266348			x													
4h WT f 0.5Gy	30266347			x													
4h WT f 0.5Gy	30266355	x															
4h Mut f 0.5Gy	30266323																
4h Mut f 0.5Gy	30266316	x		x													
4h Mut f 0.5Gy	30266315			x													
Total 44		9	7	19	0	2	0	1	2	1	1	1	4	0	0	1	1

Anhang

Histology 18M p.i.		Anterior					Lens/bow region					Posterior					Nucleus		additional changes	
Sample	ID	enlarged/s wollen fiber cells	detachments	small vacuoles	fissures	misslocated nuclei	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	enlarged/s wollen fiber cells	small vacuoles	misslocated nuclei	fissures	misslocated nuclei	Posterior Subcapsular Cataract (PSC)	enlarge/s wollen fiber cells	small vacuoles	misslocated nuclei	2 centers	small vacuoles	Retina	misslocated nuclei in the cortex
18M WT m sham	30266836	x	x			x		x							x					
18M WT m sham	30298512	x	x																	
18M WT m sham	30309150																			
18M Mut m sham	30309190																			
18M Mut m sham	30298559	x				x														
18M WT m 63mGy	30309139	x																		
18M WT m 63mGy	30309146	x				x														
18M WT m 63mGy	30309138																			
18M Mut m 63mGy	30309176																			
18M Mut m 63mGy	30309186	x	x																	
18M Mut m 63mGy	30309177	x				x														
18M WT m 125mGy	30298507	x																		
18M WT m 125mGy	30298500	x				x														
18M WT m 125mGy	30298499	x				x														
18M Mut m 125mGy	30298554	x				x														
18M Mut m 125mGy	30266852	x				x														
18M WT m 0.5Gy	30266345	x	x			x														
18M WT m 0.5Gy	30266337	x				x														
18M WT m 0.5Gy	30266338	x				x														
18M Mut m 0.5Gy	30266305	x																		
18M Mut m 0.5Gy	30266313	x	x																	
18M WT f sham	30266844	x	x																	
18M WT f sham	30298532	x	x			x														
18M Mut f sham	30266860	x				x														
18M Mut f sham	30298579	x				x														
18M WT f 63mGy	30309158	x	x			x														
18M WT f 63mGy	30309159	x				x														
18M WT f 63mGy	30309166	x				x														
18M Mut f 63mGy	30309199	x	x			x														
18M Mut f 63mGy	30309198	x				x														
18M Mut f 63mGy	30309206	x	x			x														
18M WT f 125mGy	30298515	x				x														
18M WT f 125mGy	30298516	x				x														
18M Mut f 125mGy	30298523	x				x														
18M Mut f 125mGy	30298562	x				x														
18M Mut f 125mGy	30298563	x				x														
18M Mut f 125mGy	30298570	x				x														
18M WT f 0.5Gy	30266353	x				x														
18M WT f 0.5Gy	30266354	x				x														
18M Mut f 0.5Gy	30266361	x	x			x														
18M Mut f 0.5Gy	30266321	x				x														
18M Mut f 0.5Gy	30266322	x	x			x														
18M Mut f 0.5Gy	30266329	x	x			x														
Total 43		33	28	0	7	22	1	4	26	0	0	34	15	11	23	5				

Anhang

Sample	ID	Anterior					Lens/bow region					Posterior					Nucleus		additional changes	
		enlarged/s wollen fiber cells	detachments	small vacuoles	fissures	mislocated nuclei	Anterior Subcapsular Cataract (ASC)	enlarged/s wollen fiber cells	small vacuoles	fissures	mislocated nuclei	enlarged/swo llen fiber cells	Posterior Subcapsular Cataract (PSC)	fissures	mislocated nuclei	2 centers	small vacuoles	Retina		
24M WT m.sham	30260021	x	x			x														
24M WT m.sham	30291035	x																		
24M Mut m.sham	30291105																			
24M Mut m.sham	30260004	x																		
24M WT m.63mGy	30290996		x			x														
24M WT m.63mGy	30290995	x				x														
24M WT m.63mGy	30290994	x				x														
24M Mut m.63mGy	30211061																			
24M Mut m.63mGy	30211063	x																		
24M Mut m.63mGy	30291062																			
24M WT m.0.125Gy	30280480																			
24M WT m.0.125Gy	30280478																			
24M WT m.0.125Gy	30280477	x				x														
24M Mut m.0.125Gy	30280526																			
24M Mut m.0.125Gy	30280528																			
24M WT m.0.5Gy	30260364	x				x														
24M WT m.0.5Gy	30260362																			
24M WT m.0.5Gy	30260365																			
24M Mut m.0.5Gy	30260402	x																		
24M Mut m.0.5Gy	30260406																			
24M Mut m.0.5Gy	30260403	x				x														
24M WT f.sham	30280522	x				x														
24M WT f.sham	30291040	x																		
24M WT f.sham	30260026	x				x														
24M Mut f.sham	30211108	x				x														
24M Mut f.sham	30260011	x				x														
24M Mut f.sham	30280570	x				x														
24M WT f.63mGy	30291015	x																		
24M WT f.63mGy	30291016	x				x														
24M Mut f.63mGy	30291082	x				x														
24M Mut f.63mGy	30291081	x				x														
24M WT f.0.125Gy	30280506	x				x														
24M WT f.0.125Gy	30280514	x																		
24M Mut f.0.125Gy	30280554	x																		
24M Mut f.0.125Gy	30280559	x				x														
24M Mut f.0.125Gy	30280555	x				x														
24M Mut f.0.5Gy	30260384																			
24M WT f.0.5Gy	30260381																			
24M Mut f.0.5Gy	30260382																			
24M Mut f.0.5Gy	30260428																			
24M Mut f.0.5Gy	30260426	x				x														
Total 41		26	13	3	9	21	1	3	30	6	2	38	15	6	4	16	8	0	3	3

Anhang

Metabolitenspektrum des Biocrates IDQ-Kits

Metabolite Class	short_name	Biochemical Name
acylcarnitines	C0	DL-Carnitine
	C10	Decanoyl-L-carnitine
	C10:1	Decenoyl-L-carnitine
	C10:2	Decadienyl-L-carnitine
	C12	Dodecanoyl-L-carnitine
	C12:1	Dodecenoyl-L-carnitine
	C12-DC	Dodecanedioyl-L-carnitine
	C14	Tetradecanoyl-L-carnitine
	C14:1	Tetradecenoyl-L-carnitine
	C14:1-OH	Hydroxytetradecenoyl-L-carnitine
	C14:2	Tetradecadienyl-L-carnitine
	C14:2-OH	Hydroxytetradecadienyl-L-carnitine
	C16	Hexadecanoyl-L-carnitine
	C16:1	Hexadecenoyl-L-carnitine
	C16:1-OH	Hydroxyhexadecenoyl-L-carnitine
	C16:2	Hexadecadienyl-L-carnitine
	C16:2-OH	Hydroxyhexadecadienyl-L-carnitine
	C16-OH	Hydroxyhexadecanoyl-L-carnitine
	C18	Octadecanoyl-L-carnitine
	C18:1	Octadecenoyl-L-carnitine
	C18:1-OH	Hydroxyoctadecenoyl-L-carnitine
	C18:2	Octadecadienyl-L-carnitine
	C2	Acetyl-L-carnitine
	C3	Propionyl-L-carnitine
	C3:1	Propenyl-L-carnitine
	C3-DC / C4-OH	Malonyl-L-carnitine / Hydroxybutyryl-L-carnitine
	C3-DC-M / C5-OH	Methylmalonyl-L-carnitine / Hydroxyvaleryl-L-carnitine
	C3-OH	Hydroxypropionyl-L-carnitine
	C4	Butyryl-L-carnitine
	C4:1	Butenyl-L-carnitine
	C4:1-DC / C6	Fumaryl-L-carnitine / Hexanoyl-L-carnitine
	C5	Valeryl-L-carnitine
	C5:1	Tiglyl-L-carnitine
	C5:1-DC	Glutaconyl-L-carnitine
	C5-DC / C6-OH	Glutaryl-L-carnitine / Hydroxyhexanoyl-L-carnitine
	C5-M-DC	Methylglutaryl-L-carnitine
	C6:1	Hexenoyl-L-carnitine
	C7-DC	Pimelyl-L-carnitine

Anhang

	C8	Octanoyl-L-carnitine
	C8:1	Octenoyl-L-carnitine
	C9	Nonayl-L-carnitine
sugars	H1	Hexose

amino acids	Arg	Arginine
	Gln	Glutamine
	Gly	Glycine
	His	Histidine
	Met	Methionine
	Orn	Ornithine
	Phe	Phenylalanine
	Pro	Proline
	Ser	Serine
	Thr	Threonine
	Trp	Tryptophan
	Tyr	Tyrosine
	Val	Valine
	xLeu	xLeucine
glycerophospholipids	lysoPC a C14:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C14:0
	lysoPC a C16:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C16:0
	lysoPC a C16:1	lysoPhosphatidylcholine acyl C16:1
	lysoPC a C17:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C17:0
	lysoPC a C18:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C18:0
	lysoPC a C18:1	lysoPhosphatidylcholine acyl C18:1
	lysoPC a C18:2	lysoPhosphatidylcholine acyl C18:2
	lysoPC a C20:3	lysoPhosphatidylcholine acyl C20:3
	lysoPC a C20:4	lysoPhosphatidylcholine acyl C20:4
	lysoPC a C24:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C24:0
	lysoPC a C26:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C26:0
	lysoPC a C26:1	lysoPhosphatidylcholine acyl C26:1
	lysoPC a C28:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C28:0
	lysoPC a C28:1	lysoPhosphatidylcholine acyl C28:1
	lysoPC a C6:0	lysoPhosphatidylcholine acyl C6:0
	PC aa C24:0	Phosphatidylcholine diacyl C 24:0
	PC aa C26:0	Phosphatidylcholine diacyl C 26:0
	PC aa C28:1	Phosphatidylcholine diacyl C 28:1
	PC aa C30:0	Phosphatidylcholine diacyl C 30:0
	PC aa C30:2	Phosphatidylcholine diacyl C 30:2
	PC aa C32:0	Phosphatidylcholine diacyl C 32:0
	PC aa C32:1	Phosphatidylcholine diacyl C 32:1
	PC aa C32:2	Phosphatidylcholine diacyl C 32:2
	PC aa C32:3	Phosphatidylcholine diacyl C 32:3
	PC aa C34:1	Phosphatidylcholine diacyl C 34:1
	PC aa C34:2	Phosphatidylcholine diacyl C 34:2
	PC aa C34:3	Phosphatidylcholine diacyl C 34:3
	PC aa C34:4	Phosphatidylcholine diacyl C 34:4

Anhang

	PC aa C36:0	Phosphatidylcholine diacyl C 36:0
	PC aa C36:1	Phosphatidylcholine diacyl C 36:1
	PC aa C36:2	Phosphatidylcholine diacyl C 36:2
	PC aa C36:3	Phosphatidylcholine diacyl C 36:3
	PC aa C36:4	Phosphatidylcholine diacyl C 36:4
	PC aa C36:5	Phosphatidylcholine diacyl C 36:5
	PC aa C36:6	Phosphatidylcholine diacyl C 36:6
	PC aa C38:0	Phosphatidylcholine diacyl C 38:0
	PC aa C38:1	Phosphatidylcholine diacyl C 38:1
	PC aa C38:3	Phosphatidylcholine diacyl C 38:3
	PC aa C38:4	Phosphatidylcholine diacyl C 38:4

glycerophospholipids	PC aa C38:5	Phosphatidylcholine diacyl C 38:5
	PC aa C38:6	Phosphatidylcholine diacyl C 38:6
	PC aa C40:1	Phosphatidylcholine diacyl C 40:1
	PC aa C40:2	Phosphatidylcholine diacyl C 40:2
	PC aa C40:3	Phosphatidylcholine diacyl C 40:3
	PC aa C40:4	Phosphatidylcholine diacyl C 40:4
	PC aa C40:5	Phosphatidylcholine diacyl C 40:5
	PC aa C40:6	Phosphatidylcholine diacyl C 40:6
	PC aa C42:0	Phosphatidylcholine diacyl C 42:0
	PC aa C42:1	Phosphatidylcholine diacyl C 42:1
	PC aa C42:2	Phosphatidylcholine diacyl C 42:2
	PC aa C42:4	Phosphatidylcholine diacyl C 42:4
	PC aa C42:5	Phosphatidylcholine diacyl C 42:5
	PC aa C42:6	Phosphatidylcholine diacyl C 42:6
	PC ae C30:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 30:0
	PC ae C30:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 30:1
	PC ae C30:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 30:2
	PC ae C32:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 32:1
	PC ae C32:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 32:2
	PC ae C34:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 34:0
	PC ae C34:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 34:1
	PC ae C34:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 34:2
	PC ae C34:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 34:3
	PC ae C36:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:0
	PC ae C36:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:1
	PC ae C36:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:2
	PC ae C36:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:3
	PC ae C36:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:4
	PC ae C36:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 36:5
	PC ae C38:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:0
	PC ae C38:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:1
	PC ae C38:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:2
	PC ae C38:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:3
	PC ae C38:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:4
	PC ae C38:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:5

Anhang

	PC ae C38:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 38:6
	PC ae C40:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:0
	PC ae C40:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:1
	PC ae C40:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:2
	PC ae C40:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:3
	PC ae C40:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:4
	PC ae C40:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:5
	PC ae C40:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 40:6
	PC ae C42:0	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:0
	PC ae C42:1	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:1
	PC ae C42:2	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:2
	PC ae C42:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:3
	PC ae C42:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:4
	PC ae C42:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 42:5
	PC ae C44:3	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 44:3
	PC ae C44:4	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 44:4
	PC ae C44:5	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 44:5
	PC ae C44:6	Phosphatidylcholine acyl-alkyl C 44:6
sphinglipids	SM (OH) C14:1	Hydroxyshingomyeline C 14:1
	SM (OH) C16:0	Hydroxyshingomyeline C 16:0
	SM (OH) C22:1	Hydroxyshingomyeline C 22:1
	SM (OH) C22:2	Hydroxyshingomyeline C 22:2
	SM (OH) C24:1	Hydroxyshingomyeline C 24:1
	SM C16:0	Shingomyeline C 16:0
	SM C16:1	Shingomyeline C 16:1
	SM C18:0	Shingomyeline C 18:0
	SM C18:1	Shingomyeline C 18:1
	SM C20:2	Shingomyeline C 20:2
	SM C22:3	Shingomyeline C 22:3
	SM C24:0	Shingomyeline C 24:0
	SM C24:1	Shingomyeline C 24:1
	SM C26:0	Shingomyeline C 26:0
	SM C26:1	Shingomyeline C 26:1