



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

MULTIPARAMETRISCHE ERFASSUNG VON STRAHLENWIRKUNGEN ZUR ABSCHÄTZUNG DER INDIVIDUELLEN STRAHLENEMPFINDLICHKEIT

BMU - 2006-677



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2006-677

**„Multiparametrische Erfassung von Strahlenwirkungen
zur Abschätzung der individuellen
Strahlenempfindlichkeit“**

**GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für
Strahlenbiologie, Postfach 1129, 85758 Neuherberg**

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2006

Inhalt:

Kurzfassung	4
I. Teil: Kurze Darstellung	7
1. Zielsetzung	7
2. Aufgabenstellung	7
3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	8
3.1 Partner	8
3.2 Testsysteme	10
3.3 Zell-Populationen	10
4. Planung und Ablauf des Vorhabens	12
4.1 1. Phase	12
4.2 2. Phase	15
4.3 3. Phase	16
5. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	17
5.1 Wissenschaftliche Grundlagen	17
5.2 Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren, Schutzrechte	20
5.3 Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsquellen	20
5.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	24
II. Teil: Eingehende Darstellung	25
1. Arbeiten mit den Zelllinien	
1.1 Messen der Überlebensrate durch Farbstoff-Ausschluss (Trypanblau, Propidiumjodid)	25
1.2 Etablierung verschiedener FACS-basierender Apoptose- Tests (AnnexinV (Pharmingen), DNA Fragmentierungs Assay (Pharmingen), Apo2.7 (Immunotech), Caspase-3 (Pharmingen))	28
1.3 Analyse des Zellzyklus	32
1.4 Messung der Mikrokerne	34
1.5 Analyse der Chromosomenaberrationen	35
1.6. Optimierung und Anwendung des alkalischen Comet Assay	39
1.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen und ihrer Reparatur	42
1.8 Immuncytologischer Assay für 8oxo-dGuanin (mit Rubikon AG)	43
2. Arbeiten mit den klinischen Zellproben	
2.1 Erste Anwendung der Testsysteme an primären Blutzellen	45
2.2 Überblick über den Versuchsablauf mit klinischen Proben	46
2.3 Erzielte Ergebnisse	48
2.3.1 Standardisierte Präparation d. Blutzellen aus Patientenblut	48
2.3.2 Analyse der Apoptose in vitro-bestrahlter Lymphozyten aus Blutproben	50
2.3.3. Analyse der DNA Reparaturkapazität in vitro-bestrahlter Lymphozyten aus Blutproben mit dem Comet Assay	52

2.4. Statistische Auswertung	55
2.4.1. Apoptose	55
2.4.2. Comet Assay	58
2.5. Korrelation der Ergebnisse der <i>in vitro</i> Bestrahlung von Blutproben mit klinischen <i>in vivo</i> Befunden	61
2.5.1. Heterogenität der Leukämie-Kollektive	61
2.5.2. Korrelation von <i>in vitro</i> - Daten für potentielle Sensitivität mit <i>in vivo</i> -Daten für klinische Sensitivität	64
2.6. Diskussion und Bewertung der etablierten Methoden und der Befunde	64
2.6.1. Voraussetzungen	64
2.6.2. Präparation der Lymphozyten	65
2.6.3. Bewertung der Apoptose <i>in vitro</i> bestrahlter Lymphozyten	65
2.6.4. Bewertung der DNA-Strangbruch-Reparatur <i>in vitro</i> bestrahlter Lymphozyten	66
2.6.5. Korrelation der <i>in vitro</i> Daten mit <i>in vivo</i> Befunden	66
3. Voraussichtlicher Nutzen/Verwertbarkeit	68
4. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	69
5. Veröffentlichungen der Projektnehmer	70
Anhang: Zelllinien und Methoden	72

Kurzfassung

Die Wirkungen geringer Strahlenexposition finden in der Öffentlichkeit steigende kritische Aufmerksamkeit. Die individuelle Empfindlichkeit gegenüber der clastogenen und tumorigenen Wirkung ionisierender Strahlen variiert beträchtlich. Einige Beispiele für genetisch bedingte Überempfindlichkeit aufgrund von Erbkrankheiten sind bekannt: Patienten mit den chromosomalen Instabilitätssyndromen Ataxia telangiectasia (A-T), Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) und Bloom Syndrom (BS) zeigen eine starke Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen sowie ausgeprägte Immundefekte, und sie entwickeln überdurchschnittlich oft Leukämien und Lymphome. Dieser Zusammenhang zwischen Strahlenüberempfindlichkeit und erhöhter Tumorinzidenz, sowie das gehäufte Auftreten von erhöhter Strahlenempfindlichkeit bei der Behandlung *genetisch nicht charakterisierter* Tumorpatienten legt nahe, dass innerhalb der Bevölkerungsgruppe von Tumorpatienten genetische Disposition für Strahlenüberempfindlichkeit überrepräsentiert sein kann. Fernerhin existiert in der unauffälligen Gesamtbevölkerung wahrscheinlich eine Subpopulation strahlensensitiver Individuen, z.B. heterozygote Träger der oben genannten, sowie anderer mit Strahlenüberempfindlichkeit gekoppelter Erbdefekte. Solche heterozygoten Träger der genannten Erbdefekte sind klinisch in der Regel unauffällig, können aber aufgrund von Haploinsuffizienz z.B. ein erhöhtes Tumor-Risiko aufweisen, wie anhand von Mäusen mit heterozygoten NBS-Mutationen gezeigt wurde (J.-Q. Wang, Lyon, persönliche Mitteilung). Untermauert wird dieser Befund durch die hier gezeigten erhöhten strahlen-induzierten chromosomalen Aberrationen in Zelllinien mit heterozygoten NBS-Mutationen.

Das Erkennen von Risikogruppen mit erhöhter individueller Strahlenempfindlichkeit wird daher zu einem wichtigen Ziel des Strahlenschutzes. Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurde ein Test-Verfahren für verschiedene zelluläre Parameter zur Detektion der Strahlenwirkung etabliert. Blutentnahme, Isolierung und Kryokonservierung primärer Zellen wurden standardisiert durchgeführt. Die Parameter DNA-Reparatur (*Comet Assay*) und strahlen-induzierte Apoptose waren besonders geeignet, um primäre Blutzellen verschiedener Kontrollpersonen sowie verschiedener Leukämie- und Lungenkrebs-Patienten zu analysieren. Die statistische Analyse der Daten bewies, dass mehrere

Tumorpatienten, sowie überraschenderweise auch unauffällige Kontrollpersonen auftreten, deren primäre Blutzellen eine signifikant verringerte bzw. erhöhte Apoptose-Induktion oder verringerte DNA-Reparatur-Kapazität nach *in vitro*-Bestrahlung aufweisen. Vorläufig lässt sich bei den auffälligen Leukämiepatienten die zelluläre Strahlenüberempfindlichkeit nicht mit akuten klinischen Reaktionen nach *in vivo*-Bestrahlung korrelieren. Ebenso ergab der klinische Verlauf der auffälligen Lungentumorpatienten noch keine statistisch signifikanten Besonderheiten. Die Analyse weiterer Patientenproben sowie weiterer Kontrollen sollte eine statistisch signifikante Korrelation der experimentellen mit klinischen Parametern erwarten lassen.

Summary

The effects of low dose irradiation are highly relevant for radiation protection in the public. The sensitivity to clastogenic and tumorigenic effects of ionizing radiation (IR) varies considerably amongst individuals. Examples for genetically determined enhanced sensitivity are well known in some hereditary diseases: patients with chromosomal instability syndromes, Ataxia telangiectasia (A-T), Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) and Bloom Syndrome (BS) show strongly enhanced sensitivity towards IR, severe immunodeficiencies, and a high incidence for developing leukemias and lymphomas. This obvious coincidence of enhanced radiosensitivity and tumor risk, and the frequently observed enhanced radiosensitivity of *genetically non-defined* tumor patients indicate that tumor patients may constitute a subpopulation with enriched genetical predisposition for enhanced radiosensitivity. Furthermore, a subpopulation of radiosensitive individuals may be part of the probably inconspicuous total population. For example, individuals heterozygous for the above mentioned genes (and possibly some other genes) show enhanced radiosensitivity if compared with the normal population. In general, heterozygous carriers of those hereditary deficiencies are clinically inconspicuous, but due an haploinsufficiency their tumour risk may be enhanced. This has been shown for mice carrying an heterozygous Nbs1 mutation (J.-Q. Wang, Lyon, pers. Communication). Our findings concerning enhanced radiation-induced chromosomal aberrations in heterozygous Nbs1 cell lines support this notion.

The identification of high risk groups with enhanced radiosensitivity is therefore an important task for radioprotection. This project aimed at establishing a procedure which allows to test various cellular parameters as indicators for effects of radiation. A standard protocol for the isolation and cryoconservation of primary blood cells was developed. DNA repair analysis (Comet Assay) and radiation-induced apoptosis were particularly suitable for the analysis of primary blood cells of control persons and of leukemia and lung tumor patients. Statistical analysis of the data revealed that the primary blood cells of some tumor patients and, surprisingly, of a few inconspicuous individuals from the control population (KORA-S2000) showed significantly reduced or enhanced levels of radiation-induced apoptosis and DNA repair after irradiation *in vitro*. Unfortunately, there is no significant correlation yet of increased *in vitro* cellular radiosensitivity and acute clinical reactions following *in vivo* irradiation, neither for lung tumor patients nor for leukemia patients. With increasing numbers of cases analysed, it is expected that a correlation will show up.

I. Teil - Kurze Darstellung

1. Zielsetzung

Durch Anwendung mehrerer unabhängiger funktioneller Verfahren auf zellbiologischer Ebene sollte eine geeignete Kombination von Messparametern gefunden werden, die zur Bestimmung der individuellen Strahlensensibilität geeignet ist. Diese Verfahren sollen an einer limitierten Anzahl isolierter Blutzellen aus Patienten und Kontrollpersonen anwendbar sein, um eine Aussage über potentielle Strahlenempfindlichkeit (z.B. bei Tumorpatienten) zu ermöglichen. Langfristig soll ein „Test-System“ zur (präventiven) Diagnose von erhöhter Strahlenempfindlichkeit entwickelt werden. Dieses Testsystem könnte auf Testverfahren zellulärer Strahlensensibilität basieren, die in dieser Studie ausgewählt und optimiert wurden. Weiterhin sollte in zukünftigen Analysen die Beteiligung prädisponierender Kandidaten-Gene und – Proteine eingeschlossen werden.

2. Aufgabenstellung

Aufgabe dieses Projekts StSch4360 war es, die Wirkung ionisierender Strahlung (IR) auf Zellpopulationen unterschiedlicher Herkunft zu untersuchen. Es sollten hierzu zunächst Verfahren ausgewählt, standardisiert und optimiert werden, die

- (1) einfach und kostengünstig durchzuführen sind;
- (2) auf möglichst breiter Basis die *zelluläre* Strahlenwirkung erfassen;
- (3) grosse Sensitivität gepaart mit gutem Differenzierungsvermögen zwischen „sensitiv“ und „resistent“ - bei möglichst niedrigen Strahlendosen – zeigen;
- (4) an Materialien von Tumorpatienten vorgenommen werden können, die einer Strahlentherapie bzw. Ganzkörperbestrahlung unterliegen;
- (5) experimentelle *in vitro*-Bestrahlung beinhalten, um die Entwicklung prädiktiver Testverfahren zu ermöglichen;
- (6) bzgl. der Anzahl und Auswahl der Proben und Experimente statistischen Erfordernissen genügen, die eine signifikante Aussage bezüglich individueller Strahlenempfindlichkeit erlauben.

Mit Hilfe etablierter lymphoblastoider Zelllinien, die genetisch determinierte strahlensensitive bzw. – resistente Phänotypen aufweisen, sollten zunächst diejenigen Verfahren ausgesucht werden, die am besten den oben genannten Kriterien genügen. Es wurden letztendlich zwei zelluläre (funktionelle) Testsysteme, der *Comet Assay* für die Analyse von *DNA Doppel- und Einzelstrangbrüchen* und der *FACS-basierende AnnexinV/Propidiumjodid Assay* für die differenzierte Analyse von *Apoptose/Nekrose* ausgewählt.

Diese Assays wurden für 2 Kollektive genetisch nicht charakterisierter Tumor-Patienten (Leukämie-Patienten; junge Lungentumor-Patienten) eingesetzt. Die klinisch unauffälligen Kontroll-Personen wurden aus einer groß angelegten, bevölkerungs-basierenden Studie (KORA S2000) rekrutiert. Es sollte zunächst an primären Lymphozyten der Testpersonen untersucht werden, ob sich Fälle von auffälliger, erhöhter Strahlenempfindlichkeit nachweisen lassen. Bei positivem Ergebnis sollte eine Korrelation der Daten aus *in vitro*-Analysen der Lymphozyten mit klinischen Parametern der akuten Strahlenempfindlichkeit *in vivo* und der Langzeiteffekte (5 Jahre) durchgeführt werden.

3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

3.1. Partner

Das Forschungsvorhaben wurde als Projekt des GSF-Institutes für Molekulare Strahlenbiologie („IMS“) in enger Zusammenarbeit mit mehreren Partnern durchgeführt, mit

a) GSF-Gruppe für Durchflusszytometrie („Durchflusszytometrie“): Mit dieser Gruppe wurden alle FACS-basierenden sowie Laser-zytometrischen Experimente durchgeführt

b) GSF-Institut für Epidemiologie und Abteilung für Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen („Epidemiologie“): Die Epidemiologie stellte die Proben (primäres Blut) der jungen Lungentumorpatienten (LUCY Studie) sowie der unauffälligen Kontrollpersonen aus der KORA S2000 Studie zur Verfügung, die im BfS geeignet aufgearbeitet worden sind. Die Abteilung für Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen (Prof. Bickeböller) ist für die Projektleitung dieser Kohorten mitverantwortlich.

c) Medizinische Klinik III des Klinikums Großhadern der LMU München („Klinikum Großhadern“) und

d) Klinikum der Universität Regensburg („Klinikum Regensburg“): In diesen Kliniken wurden die Blutproben der Leukämie-Patienten gewonnen, und der akute klinische Verlauf nach *in vitro*-Bestrahlung sowie ein 5jähriges ‚follow-up‘ dokumentiert.

e) BfS-Institut für Strahlenhygiene („BfS“): Hier wurden in Anlehnung an bestehende standardisierte Verfahren die *Comet Assays* von Mitgliedern des GSF-IMS durchgeführt.

f) Firma Rubikon AG: Zu Beginn des Projektes war diese Firma am vorliegenden Vorhaben beteiligt: Die Analyse des oxidierten Nukleotids 8-oxo-dGuanin (8oxoG), einem sehr häufigen durch ionisierende Strahlung und Radikale erzeugten DNA Schaden, wurde zusammen mit dieser ‚start-up‘-Firma durchgeführt, die einen immunchemischen Nachweis entwickelt hatte und die entsprechenden Kits kostenlos zur Verfügung stellte.

Am IMS wurden zunächst die organisatorischen, rechtlichen und ethischen Grundlagen geschaffen: Erstellen von

- a) Kooperations-Vereinbarungen mit allen Partnern,
- b) Patienten-Fragebögen und Einverständnis-Erklärungen sowie Dokumentationsbögen für den akuten klinischen Verlauf nach Bestrahlung für die Kliniken,
- c) Anträgen für die Ethikkommissionen, unter Mitwirkung der zuständigen Prüfärzte
- d) Organisation des Bluttransfers von den Leukämie-Kliniken zum GSF-IMS

Im IMS wurden dann die Blutproben geeignet aufgearbeitet und tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden am IMS die verschiedenen funktionellen Assays ausgetestet und standardisiert, sowie eine statistische Analyse der Ergebnisse vorgenommen.

3.2. Testsysteme

Zur Etablierung und Optimierung der Testsysteme wurden zunächst strahlensensitive und normale immortalisierte Zelllinien genetisch definierten Ursprungs verglichen. Als eigentliche Testzellen dienten später primäre Patientenzellen (Lymphoblasten) aus Tumor-Kollektiven, die in Zusammenarbeit mit den

behandelnden Ärzten aus dem Blut von Patienten gewonnen wurden. Zur Untersuchung der Strahlenwirkung *in vitro* wurden Patientenzellen vor und nach der Strahlentherapie zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden durch *in vitro*-Bestrahlung in einer ^{60}Co - γ -Quelle bezüglich ihrer Strahlenantwort charakterisiert. Zur Standardisierung der Testbedingungen für die unterschiedlichen Patientenzellen mussten die Zellen zunächst eingefroren werden, damit die Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden konnten.

Die Analyse der Strahlenwirkung sollte auf unterschiedlichen zellulären Organisationsebenen erfolgen:

- 1.) Es wurde die Strahlenempfindlichkeit auf der Ebene der Gesamtzelle gemessen. Dies geschah durch Messung der Proliferation mit und ohne *in vitro* Bestrahlung (Zellzählung), durch den Sub-G1 Test (Durchflusszytometrie), sowie durch Vitalfärbung überlebender Zellen nach Bestrahlung. Die Messung der strahlen-induzierten Apoptose wurde mit Hilfe verschiedener Testverfahren durchgeführt.
- 2.) Auf chromosomaler Ebene wurde die Strahlenempfindlichkeit durch Analyse der strahlen-induzierten Chromosomenaberrationen, sowie flusszytometrisch durch Quantifizierung der Mikrokerne charakterisiert.
- 3.) Die Reparaturkapazität der Zellen wurde untersucht nach Induktion der DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung, und zwar auf der Ebene von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (SSB, DSB) sowie von oxidativen DNA-Schäden (8oxoG). Diese DNA-Schäden haben ein grosses mutagenes Potential, wenn sie nicht oder falsch repariert werden.

3.3. Zell-Populationen

In diesem Projekt wurden folgende Populationen untersucht:

Population 1: Primäre und EBV-immortalisierte lymphoblastische Zellen von Patienten mit *Ataxia telangiectasia* (A-T) und *Nijmegen Breakage Syndrom* (NBS) mit zugehörigen strahlenresistenten Linien aus denselben Familien, sowie von normalen reparatur-kompetenten, strahlenresistenten Donoren. Diese Zellen waren bereits beim Projektleiter vorhanden und stammen u.a. aus Kooperationen mit Prof. S. Meyn (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) sowie Prof. K. Sperling (Charité, Humboldt-Universität, Berlin). Der genetische Defekt in diesen Zellen ist auf molekularer Ebene bekannt, die gendefekt-spezifischen Auswirkungen auf zellulärer

Ebene sind vielfältig. Durch Mutationen des ATM-Gens (AT mutated; Chr. 11q22) und des NBS Gens (Chr. 8q21) sind die betreffenden Zelllinien sehr empfindlich gegen IR, und sie zeigen sehr pleiotrope Phänotypen, unter anderem Defekte in der DNA Reparatur, der chromosomaler Stabilität und der Apoptose, sowie in der Regulation des Zellzyklus. Wegen dieses vielseitigen Phänotyps sind daher die Zellen für die Etablierung geeigneter Testverfahren zur Bestimmung von Strahlenempfindlichkeit besonders gut geeignet. Homozygote ATM- und NBS-Patienten zeichnen sich durch sehr komplexe klinische Merkmale aus, zu denen Strahlensensibilität und häufige Bildung von Tumoren des lymphatischen Systems gehören.

Population 2: Blutzellen aus Leukämie-Patienten, die im Zuge der Konditionierung für Knochenmarkstransplantationen bestrahlt werden (Population 2a von Prof. Holler, Klinikum Regensburg, sowie 2b von Prof. Kolb, Klinikum Großhadern). Die Analyse dieser Patientenzellen wurde als prospektive Studie angelegt, und es ist geplant, deren Ergebnisse mit dem akuten klinischen Befund des Patienten sowie der 5 jährigen Nachuntersuchung nach Ganzkörperbestrahlung zu korrelieren. Das Kollektiv umfasst alle im Antragszeitraum aufgetretenden Fälle von Leukämie (insgesamt 70 Patienten: 40 aus Regensburg und 30 aus München), also auch solche, die aufgrund einer Abstoßungsreaktion (*graft versus host disease*, GvHD) nach der Konditionierung starke Strahlenüberempfindlichkeit aufweisen (Holler *et al.*, 1997).

Population 3: Blutzellen aus jungen Lungentumor-Patienten, bei denen aufgrund des geringen Alters bei Ausbruch der Tumore eine genetische Prädisposition bzgl. der Krebsentstehung vermutet wird (DFG-Studie zu erblichen Risikofaktoren für Lungenkrebs, BI 576/2-1, „LUCY“; <http://www.dfg.de/gepris>). Es ist von Interesse herauszufinden, ob sich die vermutete Prädisposition für Krebs gegebenenfalls als zelluläre Strahlenüberempfindlichkeit auswirken kann. Die Proben wurden ursprünglich von Patienten gewonnen, die in der Regel noch keiner Strahlen- oder Chemotherapie unterzogen wurden (Kooperation mit dem GSF-Institut für Epidemiologie, Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann und Abt. Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen, Leitung Fr. Prof. Dr. H. Bickeböller).

Population 4: Blutzellen aus klinisch unauffälligen Personen, die im Rahmen einer bevölkerungs-basierenden Studie (KORA S 2000) gewonnen wurden, siehe

<http://www.gsf.de/kora/projekte.html> (Kooperation mit dem GSF-Institut für Epidemiologie, Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann).

Standardkontrolle: Blutzellen einer gesunden Person, die wie die Blutzellen der Leukämiepatienten aufgearbeitet wurden, wurden bei jedem Versuch mitgeführt. Dieses Vorgehen ermöglicht eine Aussage über die Reproduzierbarkeit/Schwankungsbreite des jeweiligen Assays (Berechnung der 95 % Konfidenz des Gruppenmittelwertes der Messproben auf der Basis der Streuung der Standardkontrolle).

Anmerkung: Im ursprünglichen Antrag wurden als Population 2 etwa 10 - 20 Zellproben von Immundefizienz – und Tumorpatienten bezeichnet, die als Kooperation vom MRC Brighton, UK, in unser Projekt eingehen sollen. Trotz Kooperationsvereinbarung wurden diese Zelllinien wegen akuter Interessen des MRC an ähnlichen Experimenten und Interessens-Überschneidung nicht zur Verfügung gestellt. Dieser ‚Verlust‘ an Zellproben wurde durch das Mitführen der Standardkontrolle (unauffälliger Proband) in jedem Experiment bezüglich des experimentellen Aufwands deutlich kompensiert und gleichzeitig eine Standardisierbarkeit der Experimente ermöglicht.

4. Planung und Ablauf des Vorhabens

4.1. 1. Phase (01.10.2000 - 30.9.2001)

In der 1. Phase wurden Strategien zum optimalen Materialtransfer von der Klinik zum molekular-/zellbiologischen Labor entwickelt, da es sich sehr schnell herausgestellt hatte, dass die Qualität der Blutproben einen sehr entscheidenden Einfluss auf verschiedene Assays (z.B. für Apoptose, siehe II.2.1.) hatte.

Es wurden fernerhin mit Hilfe immortalisierter strahlensensibler und –resistenter Zelllinien die Methoden zur Messung der Strahlenwirkung nach *in vitro*-Bestrahlung etabliert und standardisiert. Hierzu wurden die etablierten Linien aus strahlensensitiven AT- und NBS-Patienten und die dazu gehörenden Kontrolllinien, sowie normale Zelllinien verwendet (Population 1).

Folgende Analysen wurden durchgeführt:

1. Ebene der Gesamtzelle: Proliferationsstudien und Trypanblau-Test zur Quantifizierung vitaler Zellen; Zellzyklus-Analyse; FACS-basierende Assays für

Apoptose (Sub-G1-, AnnexinV-, Caspase3- und Apo 2.7 Test) nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung.

Auswertung: Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass an immortalisierten Zelllinien Proliferationsstudien und Trypanblau-Test eine verlässliche Unterscheidbarkeit strahlen-überempfindlicher Zellen von den jeweiligen Kontrollen ermöglichten. Zellzyklus-Analysen konnten die spezifischen ‚*checkpoint*‘-Defekte in AT- und NBS-Zellen verlässlich nachweisen. Alle FACS-basierenden Testsysteme zur Detektion strahlen-induzierter Apoptose waren geeignet, strahlen-überempfindliche (aber immortalisierte) Zellen von ihren Kontrollen zu unterscheiden.

2. Chromosomale Ebene: Strahlen-induzierte Chromosomenaberrationen (vom Chromosomen-, und Chromatid-Typ), Mikrokerne (FACS).

Auswertung: Die Analyse der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in AT- und NBS-Zellen sowie deren Kontrollen konnten nicht nur Patientenzellen von normalen Kontrollen unterscheiden, sondern im Falle von NBS sogar heterozygote Träger der Defekte (obligate Heterozygote derselben Familie) erkennen lassen. Der Nachweis von durch Bestrahlung induzierten Mikrokernen war sehr zufriedenstellend verlaufen und konnte in den verwendeten immortalisierten Testzellen homozygote Träger von NBS-Mutationen eindeutig als strahlenempfindlich charakterisieren. Auch heterozygote Träger der Mutation waren in diesem Testsystem strahlenauffällig, allerdings mit geringerer statistischer Signifikanz.

3. DNA-Reparatur: Comet Assay (Quantifizierung der Induktion und Reparatur von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen); Quantifizierung der Induktion und Reparatur von 8oxoG (ICA Assay der Firma Rubikon AG mit 8oxoG-spezifischen Antikörpern).

Auswertung: Der Comet assay konnte sehr gut standardisiert werden, wenngleich eine verlässliche Unterscheidung der strahlen-sensitiven AT- und NBS-Testzellen (wie auch in der Fachliteratur beschrieben) nicht erreicht wurde. Die Messung der 8oxoG-Schäden und deren Reparatur konnte nach deren Induktion mit H_2O_2 nur geringe Unterschiede aufdecken, die zudem nicht statistische Signifikanz aufwiesen. Die ursprüngliche Detektion per FACS wurde auf ein Laser-Zytometer ausgeweitet, welcher eine bessere Detektion der Schäden ‚*in situ*‘, also auf dem Objektträger liefern sollte. Auch diese umfangreichen Vorexperimente lieferten keine

zufriedenstellenden Ergebnisse, darüber hinaus konnten nach *in vitro* Bestrahlung keine zufriedenstellenden Induktionswerte erzielt werden. Als Schwachpunkt dieses Verfahrens kann eine möglicherweise ungenügende Spezifität des verwendeten Antikörpers, sowie die spontane Entstehung von 8oxoG durch Sauerstoff der Umgebung im Verlaufe des Versuchsprotokolls angesehen werden. Die Analysen wurden daher nach umfangreichen Bemühungen der Optimierung eingestellt, da zum damaligen Zeitpunkt keine gut etablierten, vergleichbaren und preiswerten Assays zur Detektion von 8oxoG existierten.

Vorbereitung für Phase 2: In einer Vorlauf-Phase wurden primäre Zellen (Lymphoblasten, Leukozyten) der Populationen 2a und 2b in Zusammenarbeit mit den behandelnden Ärzten aus dem Blut der genannten Patienten gewonnen und eingefroren. Entsprechende primäre Zellen der Populationen 3 und 4 sowie einer Standardkontrolle wurden nach vergleichbaren Protokollen im BfS-Institut für Strahlenhygiene bearbeitet. Einige der in Phase 1 etablierten Methoden konnten für primäre Blutzellen (B-, T-Lymphozyten) sehr gut standardisiert werden. Wichtig ist hierbei jedoch die Tatsache, dass alle auf aktiver Proliferation basierenden Methoden, die mit den immortalisierten Zellen gute Ergebnisse lieferten, auf die primären Zellen nicht übertragbar waren. Die aus dem Blut isolierten Blutzellen wurden nicht mit PHA stimuliert und waren – bei der Standardkontrolle und den Kontrollzellen der Population 4 - mehrere Tage lebensfähig und in in genügender Anzahl vorhanden, replizierten jedoch nicht. Die Patientenzellen waren generell weniger vital und nur in geringerer Menge isolierbar. Die chromosomalen Analysen wurden zwar anfangs in einem getrennten Ansatz nach PHA-Stimulierung durchgeführt, lieferten jedoch bei den Patientenproben aufgrund zu geringer Zellzahlen bei den Leukämiepatienten keine auswertbaren Ergebnisse. Als alternativer Ansatz wurde daher zusätzlich die Analyse der DNA-Brüche mittels *Pulsed field* Gel-Elektrophorese (PFGE) zunächst exemplarisch bei immortalisierten Kontrollzellen durchgeführt, um einen möglichen weiteren Parameter anbieten zu können. Überraschenderweise ließ dieser Test keine Korrelation zur zellulären Strahlenempfindlichkeit bei NBS-Zellen erkennen und war somit für die Anwendung bei den klinischen Proben nicht geeignet.

Bei den primären Blutzellen wurde anstelle des Trypanblau-Tests (Vitalfärbung überlebender Zellen) Propidiumjodid (PI) verwendet, das zur

Darstellung nekrotischer Zellen in einem einzigen Versuchsansatz zusammen mit FACS-basierten Apoptose-Assays eingesetzt werden konnte. Die Messung der strahlen-induzierten Apoptose konnte durch gleichzeitige Detektion der B- und T-Lymphozyten mittels spezifischer Antikörper optimiert werden und stellte somit eine sensitive, aussagekräftige Methode dar. Zusammengefasst stützen sich alle im weiteren vorgestellten Analysen mit Blutzellen von Patienten und Kontrollpersonen im wesentlichen auf den Comet Assay (Induktion und Reparatur von DNA-Brüchen) und die Analyse der strahleninduzierten Apoptose.

4.2. 2. Phase (01.10.2001 – 31.10.2003)

In dieser Phase wurde das geeignet aufgearbeitete Blut von genetisch nicht charakterisierten Patienten mit Hilfe der in Phase 1 standardisierten Testsysteme analysiert. Es wurden 70 Proben von Leukämiepatienten der klinischen Kooperationspartner Prof. Holler und Prof. Kolb (40 bzw. 30 Proben von Population 2a und 2b) sowie 24 Proben der LUCY-Studie und 60 Proben der KORA S2000 Studie von Prof. Wichmann (Populationen 3 und 4) für die Analyse vorbereitet und weitgehend, wenn auch leider nicht vollständig analysiert.

Die Verzögerung in der Fertigstellung des Projektes und die Tatsache, dass nicht die ursprünglich im Projekt-Antrag postulierten Fallzahlen bei den klinischen Proben erreicht wurden, hatte mehrere, ihrer Natur nach unterschiedliche Gründe:

Erstens muss an dieser Stelle betont werden, dass in jedem Experiment mit klinischen Proben eine interne Standardkontrolle mitgeführt wurde, die im ursprünglichen Antrag nicht vorgesehen war. Bei der Durchführung der zeit- und material-aufwendigen *Comet Assays* (in der Regel werden hier nur 3 Patientenproben pro Experiment analysiert) schlägt diese Tatsache besonders zu Buche. Die interne Standardkontrolle erweitert die ursprünglich vorgeschlagenen ‚Kollektive‘ und ist aus Gründen der Standardisierbarkeit der Experimente, sowie der nachfolgenden statistischen Analyse, von ausgesprochen hohem wissenschaftlichen Wert.

Zweitens konnte die von den klinischen Partnern zugesprochene und bei der Planung der Studie eingeplante Zahl von etwa 40-50 Patienten pro Jahr nicht eingehalten werden. Strukturelle/personelle Massnahmen (Finanzierung einer AiP Stelle in der Klinik) verbesserten die Situation, führten dann jedoch im letzten Jahr zu Probenzahlen, die die Laborkapazitäten des IMS und BfS überforderten. Zweitens

konnte die in Aussicht gestellte und beim Projektantrag berücksichtigte automatische Analyse und Auswertung des *Comet Assay* aufgrund technischer Probleme nicht rechtzeitig etabliert werden. Dies führte zu einer beträchtlichen Verzögerung der *Comet Assay*-Experimente, da die ‚manuelle Auswertung‘ der *Comet Assays* enorm zeitaufwendig war. Da die *Comet Assay*-Experimente gleichzeitig den zeitlich größten Aufwand der experimentellen Arbeiten darstellten, wurde das Gesamtprojekt entsprechend verzögert.

Drittens schieden vor Ablauf des Projektes unerwartet mehrere Mitarbeiter/innen aus verschiedenen Gründen aus, die an dem Projekt mitarbeiten sollten. Schwerwiegend war das vorzeitige Ausscheiden der durch das Projekt finanzierten Leiterin der experimentellen Arbeiten, Frau Dr. L. Bauerschaper (geb. Wolz) Ende 2003. Zum Glück konnte zum 01.11.2003 als Nachfolgerin Frau S. Wilde gewonnen werden, die sich als Diplomandin bei Dr. E. Fritz gute Methodenkenntnis erworben hatte und die Arbeiten von Frau Bauerschaper übernehmen konnte. Als der Projektleiter Dr. E. Fritz im Herbst 2003 eine neue Stelle am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena antrat, übernahm Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp (GSF-IMS) anteilig die Projektleitung an der GSF. Alle wichtigen Entscheidungen wurden im Konsens mit Dr. Fritz getroffen.

4.3. 3. Phase (01.11.2003 - 31.3.2004)

Die letzte Phase (genehmigte kosten-neutrale Verlängerung um 4 Monate) diente dem vorläufigen Abschluss der experimentellen Analysen (insbesondere der Analyse der 60 Kontrollproben aus der KORA S2000 Studie), der umfassenden Auswertung, Zusammenstellung und statistischen Bearbeitung der Daten. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die biomathematisch/statistische Analyse der experimentellen Resultate gelegt, da bei allen Kollektiven Zell-Proben auffällig wurden, deren Verhalten nach *in vitro* Bestrahlung sich von dem der Standardkontrolle deutlich unterschied. Die statistische Bearbeitung wurde von einem sehr erfahrenen Biomathematiker, Herrn H. Braselmann (AG Zytogenetik des IMS), übernommen. Er konnte untermauern, dass aus allen Kollektiven Zellproben nach *in vitro*-Bestrahlung auffällig sind bezüglich ihres Reparatur- und/oder Apoptose-Verhaltens. Diese auffallenden Proben treten gehäuft bei bestimmten

Typen von Leukämien/Lymphomen auf, wenngleich aufgrund der bisher zu geringen Fallzahlen statistisch signifikante Aussagen nicht möglich sind. Ebenfalls finden sich bisher noch keine signifikanten Korrelationen zu Merkmalen klinischer Sensitivität (Fieber, Mukositis etc.).

5. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

5.1. Wissenschaftliche Grundlagen

Die biologischen Ursachen individueller Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen (IR) können sehr unterschiedlich sein und sind nur bei Patienten mit definierten genetischen Erkrankungen hinlänglich charakterisiert. Auf zellulärer Ebene sind es vor allem die strahleninduzierten Modifikationen von Makromolekülen, hier vor allem die der DNA, die das Überleben beeinträchtigen. Die Zelle muß der genotoxischen Wirkung von strahleninduzierten Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der genomischen DNA durch entsprechende zelluläre Reaktionen, wie z.B. DNA-Reparatur entgegenwirken, um ihr Überleben zu gewährleisten. Nicht-reparierte DNA-Doppelstrangbrüche korrelieren daher meist mit zellulärer Strahlenüberempfindlichkeit (Dikomey *et al.*, 1998). Fehlerhafte Reparatur der DNA-Strangbrüche hat in der Regel mutagene und damit potentiell karzinogene Wirkung und ist somit zwar nicht immer letal für die betroffene Zelle, schädigt jedoch langfristig den Gesamtorganismus, da sie Krebs verursachen kann. Auch IR-induzierte Basenschäden wie 8oxoG haben ein stark mutagenes Potential durch Fehlpaarungen bei der Replikation, sofern sie nicht repariert werden.

Durch die Analyse genetischer Erkrankungen, die mit klinischer Überempfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen einhergehen, konnten einige der zellulären Komponenten charakterisiert werden, die der Entfernung von Strahlenschäden dienen. Die rezessiven Erbdefekte *Ataxia telangiectasia*, *Nijmegen Breakage Syndrom* und *Bloom Syndrom* betreffen Genprodukte (ATM, Nibrin und BLM), die direkt oder indirekt an der Reparatur strahlengeschädigter DNA beteiligt sind (Rotman and Shiloh, 1998; Varon *et al.*, 1998). Inzwischen wurden weitere funktions-verwandte Gene, wie z.B. ATR (Keegan *et al.*, 1996) und DNA-PK (Jackson, 1996), aufgrund ihrer starken Sequenzhomologie entdeckt. Trotz Klonierung der erwähnten DNA-Reparatur-Gene und molekularer Charakterisierung der darin kodierten Proteine sind die genaueren Mechanismen der

Schadenstolerierung aber weiterhin unbekannt. Sie umfassen sehr vielfältige zelluläre Funktionen wie DNA-Reparatur, Zellzyklusregulation, Regulation zellulärer Signalketten, programmierten Zelltod (Apoptose) usw.. Eine umfassende Analyse der Strahlenwirkung sollte also solche vielfältigen Parameter beinhalten, da sie alle gemeinsam zu dem Phänotyp „Strahlensensibilität“ beitragen.

Heterozygote Träger der beschriebenen Gendefekte, deren Bevölkerungsanteil auf mehrere Prozent geschätzt wird (zur Übersicht: Meyn, 1997), sind in der Regel klinisch unauffällig. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass z.B. heterozygote Träger eines ATM-Defekts erhöht strahlenempfindlich sind (Cole *et al.*, 1988) und wahrscheinlich eine erhöhte Prädisposition für Krebs besitzen (Bullrich *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1998; Stankovic *et al.*, 1999). Eine ähnliche Situation der erhöhten Strahlenempfindlichkeit durch erniedrigte Proteinaktivität („Haploinsuffizienz“) wird für heterozygote Träger eines vererbten NBS- und BLM-Gendefekts erwartet. So konnte z.B. gezeigt werden, daß in Mäusen mit heterozygoten NBS1-Mutationen vermehrt Tumorigenese auftritt (Z.-Q. Wang, Lyon, pers. Mitteilung). Zusammen mit anderen, bisher noch unerkannten genetischen Veränderungen, die mit Strahlenempfindlichkeit gekoppelt sind, charakterisieren solche Gendefekte daher eine Subpopulation der Bevölkerung, die vermutlich eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit besitzt, die ebenfalls mit erhöhter Disposition für Krebserkrankungen einhergeht.

Unabhängig von vererbten Mutationen in den beschriebenen DNA-Reparatur-Genen in der Keimbahn können auch somatische Mutationen die Strahlenempfindlichkeit und/oder Tumorigenese in den entsprechenden Zellklonen fördern. Es wurden z.B. Tumorzelllinien beschrieben, die zwar nicht im ATM-Gen mutiert sind und auch normale ATM-mRNA-Mengen besitzen, jedoch eine sehr geringe ATM-Proteinmenge aufweisen (Allalunis-Turner *et al.*, 1995). Diese Zellen sind ebenfalls bemerkenswert strahlensensitiv. Das Beispiel illustriert die Bedeutung bisher unbekannter Faktoren, die gänzlich unabhängig von Mutationen in den genannten DNA-Reparatur-Genen deren Aktivitäten auf Proteinebene modulieren. Gleichzeitig wird hieraus deutlich, daß eine Aktivitäts-Analyse dieser Gene auf RNA-Expressionsebene, z.B. durch neuere cDNA-*microarray*-Analysen, wenig geeignet erscheint, zumal die DNA-Reparatur-Gene, i.d.R. sehr schwach exprimiert sind und auf Transkriptionsebene nicht reguliert werden (Eckardt-Schupp & Klaus, 1999). Daher ist es von grossem Interesse, bisher noch unbekannte „modifier Gene“ zu

finden, die ggf. die Expression und Aktivität von Reparaturproteinen sensu strictu beeinflussen.

Zusätzlich zu DNA-Reparatur-Mechanismen im Zellkern wurden zytoplasmatische Faktoren beschrieben, die als Antwort auf ionisierende Strahlen das Überleben der Zelle beeinflussen. In der Regel handelt es sich um Signalproteine, die über unterschiedliche Wege Apoptose nach IR induzieren. Eine Schlüsselrolle spielen hier der Fas Membranrezeptor (auch: CD95 oder Apo1/Fas) und sein Ligand (Peter & Krammer, 1998). IR-induzierte zytoplasmatische Signalketten können über bestimmte Mediatoren Apoptoseprogramme im Zellkern auslösen. Ein wesentlicher Mediator ist das NFκB/IκB-System. Sowohl Defekte im Apo1/CD95-System als auch im NFκB/IκB -System korrelieren experimentell mit Strahlenüberempfindlichkeit. Eigene Untersuchungen hatten gezeigt, dass auch der TNFα-TNFR1-abhängige Apoptoseweg eine bedeutende Rolle bei der strahleninduzierten Apoptose spielt (Eichholtz-Wirth & Sagan 2000, 2002; Eichholtz-Wirth, Fritz, Wolz 2003). Für die Regulation dieses Weges spielt auch das NBS Genprodukt, Nibrin, eine Rolle (Eichholtz-Wirth et. al., in Vorbereitung).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass überproportional viele strahlensensitive Individuen in Tumorpatient-Kollektiven zu erwarten sind (Mohrenweiser & Jones, 1998). Ein Teil dieser Patienten wird vererbte homozygote oder heterozygote Gendefekte in den genannten Genen der DNA-Reparatur besitzen. Es ist daher zu erwarten, dass eine unterschiedliche Fähigkeit zur DNA-Reparatur wesentlich zur individuellen Strahlenempfindlichkeit beiträgt. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass eine signifikante Varianz in der DNA-Reparaturfähigkeit innerhalb der Gesamtpopulation existiert (Mohrenweiser & Jones, 1998). Unabhängig von Einflüssen der bekannten DNA-Reparatur-Gene können bisher unbekannte vererbte Gendefekte oder somatische Mutationen die individuelle Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung erhöhen. Ausserdem sind zytoplasmatische Faktoren bekannt, die möglicherweise unabhängig von der DNA-Reparaturkapazität im Zellkern Apoptose nach ionisierender Bestrahlung induzieren.

5.2. Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte

Die genannten zellbiologischen und biochemisch-/molekularbiologischen Standardmethoden wurden vom Antragsteller und den Mitarbeitern/innen der Gruppe

DNA Reparatur des IMS beherrscht oder wurden von den Kooperationspartnern als Standardmethoden etabliert. Die Arbeitsgruppe DNA Reparatur (IMS) verfügt über ein gut ausgestattetes Säugerzell-Labor, inklusive Stickstoff-Tanks zum Einfrieren der Proben und langjährige Expertise im Umgang mit Säugerzellkulturen. Weiterhin stehen zwei voll ausgestattete molekularbiologische Labors zur Verfügung. Verschiedene Strahlenquellen der GSF ermöglichten die *in vitro*-Bestrahlung der Zellen. In Kooperation mit der Abteilung Durchflusszytometrie der GSF (Dr. M. Nüsse, Dr. W. Beisker) wurden Analysen des Zellzyklus, der Apoptose und der Mikrokerne mit Hilfe eines FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) durchgeführt. Hierzu sind mehrere FACS-Geräte in der Abteilung vorhanden, das benötigte Computer-Potential zur Auswertung der Experimente, sowie die langjährige und exzellente fachliche Expertise der Gruppe, deren Leiter Dr. Nüsse allerdings vorzeitig ausschied. An den Chromosomenanalysen waren für begrenzte Zeit Gastwissenschaftler aus China, Dr. J. Cao und Dr. Z. Zhang beteiligt, die über WTZ-Projekte finanziert waren, welche leider nicht verlängert wurden.

Die externen Kooperationen am BfS-Institut für Strahlenhygiene (Comet Assays unter Begleitung der Arbeitsgruppe von Dr. T. Jung) sowie in der Firma Rubikon (8oxoG-Reparatur unter Anleitung von PD Dr. Nehls) wurden unter Ausnutzung der dort vorhandenen Infrastruktur durchgeführt.

5.3. Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Allalunis-Turner, M.J., Zia, P.K.Y., Barron, G.M., Mirzayans, R., Day, R.S.III and Lees-Miller, S.P. (1995) *Radiation Research*, 144, 288-293.

Bauchinger M., Schmid E., Braselmann H.(1997) *Mutat Res.* 12;173-8.

Baumann, M., Hölscher, T. and Begg, A.C. (2003) *Radiotherapy and Oncology* 69, 121-125. .

Blaise R., Alapetite C., Masdehors P., Merle-Beral H., Roulin C., Delic J., and Sabatier L. (2002) *Int. J. Radiat. Biol.* 78 (8), 871-879.

Bullrich, F., Rasio, D., Kitada, S., Starostik, P., Kipps, T., Keating, M., Albitar, M., Reed, J.C. and Croce, C.M. (1999) *Cancer Research*, 59, 24-7.

Chan, D.W., Gately, D.P., Urban, S., Galloway, A.M., Lees-Miller, S.P., Yen, T. and Allalunis-Turner, J. (1998) *Int. Journal of Radiation Biology*, 74, 217-24.

- Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Schreiber, S.L. and Friend, S.H. (1998) *Embo Journal*, 17, 159-69.
- Cole, J., Arlett, C.F., Green, M.H., Harcourt, S.A., Priestley, A., Henderson, L., Cole, H., James, S.E. and Richmond, F. (1988) *International Journal Of Radiation Biology*, 54, 929-43.
- Concannon, P. and Gatti, R.A. (1997) *Human Mutation*, 10, 100-7.
- Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P.J., Ross, G.M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz V.L.J., Ashworth, A. (1997) *Nature Genetics* 17, 423-430.
- Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R. and Kaina, B. (1998) *International Journal Of Radiation Biology*, 73, 269-78.
- Eckardt-Schupp, F. & Klaus, C. (1999) *Biochimie* 81, 161-171.
- Eichholtz-Wirth, H., Hietel, B (1994) *Br.J.Cancer*, 70, 579-582.
- Eichholtz-Wirth, H., Stoetzer, O., Marx, K. (1997) *Br. J Cancer*, 76, 1322-1325.
- Eichholtz-Wirth, H., Marx, K. (1998) *Anticancer Research* 18, 2989.
- Eichholtz-Wirth, H., Sagan, D. (2000) *Apoptosis* 5:255-263.
- Eichholtz-Wirth, H., Sagan, D. (2002) *Anticancer Research* 22, 235-240
- Eichholtz-Wirth, H., Fritz E., and Wolz L. (2003) *Cancer Lett.* 194, 81-90
- Fimognari C, Nusse M, Hrelia P. (1999) *Environ Mol Mutagen.*33:173-6.
- Fernet, M., Hall, J. (2004) *DNA Repair* (in press)
- Friedl, A.A., Kraxenberger, A., Eckardt-Schupp, F. (1995) *Methods: A companion to Methods in enzymology* 7, 205-218.
- Fritz, E., Elsea, S.H., Patel, P.I. and Meyn, M.S. (1997) *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 94, 4538-42.
- Fritz, E., Friedl, A.A., Zwacka, R.M., Eckardt-Schupp, F., Meyn, S.M. (2000) *Mol. Biol. Cell* 11
- Grawe J., Nusse M., Adler I.D. (1997) *Mutagenesis* 12,1-8.
- Hall, E.J., Schiff, P.B., Hanks, G.E., Brenner, D.J., Russo, J., Chen, J., Sawant, S.G. and Pandita, T.K. (1998) *Cancer Journal From Scientific American*, 4, 385-9.
- Hazra, T.K., Izumi, T., Maitt, L., Floyd, R.A., Mitra, S. (1998) *Nucl. Acids Research* 26 5116-5122.
- Holler, E., Ertl, B., Hintermeier-Knabe, R., Roncarolo, M.G., Eissner, G., Mayer, F., Fraunberger, P., Behrends, U., Pfannes, W., Kolb, H.J. and Wilmanns, W. (1997) *Leukemia And Lymphoma*, 25, 217-24.
- Huber, R., Braselmann, H., Bauchinger, M. (1992) *Int J Radiat Biol.* 61, 655-61.

- Jackson, S.P. (1996) *Cancer Surveys*, 28, 261-79.
- Jongmans, W., Vuillaume, M., Chrzanowska, K., Smeets, D., Sperling, K. and Hall, J. (1997) *Molecular And Cellular Biology*, 17, 5016-22.
- Jung, M., Kondrartyev, A., Lee, S.A., Dimtchev, A. and Dritschilo, A. (1997) *Cancer Research* 57, 24-7.
- Keegan, K.S., Holtzman, D.A., Plug, A.W., Christenson, E.R., Brainerd, E.E., Flagg, G., Bentley, N.J., Taylor, E.M., Meyn, M.S., Moss, S.B., Carr, A.M., Ashley, T. and Hoekstra, M.F. (1996) *Genes And Development*, 10, 2423-37.
- Matsuura, K., Balmukhanov, T., Tauchi, H., Weemaes, C., Smeets, D., Chrzanowska, K., Endou, S., Matsuura, S. and Komatsu, K. (1998) *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 242, 602-7.
- May, M.J., Gosh, S. (1997) *Sem. Cancer Biol.* 8, 63-69
- McCullagh, P., Nelder, J.A. (1989), *Generalized Linear Models, Second Edition, London: Chapman and Hall.*
- Meyn, M.S. (1997) *Current Topics In Microbiology And Immunology*, 221, 71-148.
- Mohrenweiser, H.W., Jones, I. M. (1998) *Mutation Research* 400, 15-24.
- Müller WU, Nüsse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. (1996) *Mutat Res.* 366:163-9.
- Myllyperkio M.H., Koski T.R., Vilpo L.M. and Vilpo J.A. (1999) *Hematol. Cell Ther.* 41(3), 95-103.
- Nagasawa, H., Latt, S.A., Lalande, M.E. and Little, J.B. (1985) *Mutat.Res.* 148, 71-82.
- Nehls P., Seiler F., Rehn B., Greferath R., Bruch J. (1997) *Environ Health Perspect.* Suppl.5:1291-6.
- Norrpa, H. (2004) *Toxicol. Lett.* 149, 309-334.
- Nüsse M., Marx K. (1997) *Mutat Res.* 392,109-15.
- Peake, J., Waugh, A., LeDeist, F., Priestley, A., Rieux-Laucat, F., Foray, N. et al. (1999) *Cancer Res* 59, 3454-60.
- Peter, M.E. & Krammer, P.H. (1998) *Current Opin. Immunol.* 10, 545-551.
- Riballo, E. et al. (1999) *Current Biology*,19, 699-702.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1998) *Human Molecular Genetics*, 7, 1555-63.
- Salassidis, K., Schmid, E., Peter, R.U., Braselmann, H., Bauchinger, M. (1994) *Mutat Res.* 311, 39-48.
- Schreiber G.A., Beisker W., Braselmann H., Bauchinger M., Bogl K.W., Nüsse M. (1992) *Int J Radiat Biol* 62, 695-709.

- Smith, G.C.M., DiFagagna, F.A., Lakin, N.D. and Jackson, S.P. (1999) *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6076-6084.
- Stankovic, T., Weber, P., Stewart, G., Bedenham, T., Murray, J., Byrd, P.J., Moss, P.A. and Taylor, A.M. (1999) *Lancet*, 353, 26-9.
- Tchirkov, A., Bay, J.O., Pernin, D., Bignon, Y.J., Rio, P., Grancho, M., Kwiatkowski, F., Giollant, M., Malet, P. and Verrelle, P. (1997) *Human Genetics*, 101, 312-6.
- Telatar, M., Wang, Z., Udar, N., Liang, T., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Lavin, M., Shiloh, Y., Concannon, P., Good, R.A. and Gatti, R.A. (1996) *American Journal Of Human Genetics*, 59, 40-4.
- Uhrhammer, N., Fritz, E., Boyden, L. and Meyn, M.S. (1999) *International Journal of Molecular Medicine*, 4, 43-47.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanová, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., Stumm, M., Weemaes, C.M., Gatti, R.A., Wilson, R.K., Digweed, M., Rosenthal, A., Sperling, K., Concannon, P. and Reis, A. (1998) *Cell*, 93, 467-76.
- Viaggi, S., Braselmann, H., Nüsse, M. (1995) *Int J Radiat Biol.* 67,193-202.
- Wright, J.A., Keegan, K.S., Herendeen, D.R., Bentley, N.J., Carr, A.M., Hoekstra, M.F. and Concannon, P. (1998) *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 95, 7445-50.
- Yamazaki, V., Wegner, R.D. and Kirchgessner, C.U. (1998) *Cancer Res* , 58, 2316-22.
- Ziv, Y., Bar-Shira, A., Pecker, I., Russel, P., Jorgensen, T., Tsarfati, I., Shiloh, Y. (1997) *Oncogene* 15, 159-167.

Internet-Adressen:

Comet Assay: <http://www.comet.itrcindia.org/definitions.htm>

KORA S2000 Studie : <http://www.gsf.de/kora/projekte.html>

„Familienstudie zur Untersuchung des Einflusses von Genen für metabolisierende Enzyme und zellzyklus-relevanter Gene auf die Suszeptibilität für Lungenkrebs im frühen Alter („LUCY“ Studie, Leitung: Prof. Dr. H. Bickeböller) <http://www.dfg.de/gepris>.

5.4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Projektpartner:

H. Braselmann (GSF-Institut für Molekulare Strahlenbiologie, AG Zytogenetik)
Prof. Dr. H. Bickeböller (Abt. Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen)
Prof. Dr. E. Holler (Universitätsklinikum Regensburg)
Prof. Dr. H. J. Kolb (GSF u. Med. Klinik III des Klinikums Großhadern, LMU München)
Dr. M. Nüsse/ Dr. W. Beisker (GSF-AG Durchflusszytometrie)
Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann (GSF-Institut für Epidemiologie)
Arbeitsgruppe Dr. T. Jung (BfS-Institut für Strahlenhygiene)
PD Dr. P. Nehls (Rubikon AG)

Weitere Kooperationen:

Dr. J. Cao (College for Radiation Medicine, Soochow University, Suzhou, PR China)
PD Dr. A.A. Friedl (Strahlenbiologisches Institut der LMU München)
Prof. Dr. S. Meyn (Hospital for Sick Children, Toronto, Kanada)
Prof. Dr. K. Sperling (Charité, Humboldt-Universität, Berlin)
Dr. Z. Zhang (Institute of Radiation Medicine, Beijing, PR China)

II. Teil - Eingehende Darstellung

1. Arbeiten mit Zelllinien

1.1 Messen der Überlebensrate durch Farbstoff-Ausschluß (Trypanblau Propidiumjodid)

Die Überlebensrate etablierter Zellen wurde durch Farbstoff-Ausschluß (Trypanblau) im Hämocytometer ermittelt (dieser Test wurde als gleichwertiger Test anstelle des MTT-Tests verwendet, der nach dem gleichen Meßprinzip verläuft). Es zeigte sich eine eindeutige Dosisabhängigkeit der Bestrahlung nach 48 bis 96 Stunden (Abb. 1). Dieser Test hat sich jedoch als schlecht standardisierbar erwiesen, da abhängig vom Experimentator beträchtliche Schwankungen der Messungen ersichtlich wurden. Der Test ist schlecht objektivierbar und z.T. von individuellen Zähleigenschaften abhängig. Gleiches wird mit dem MTT-Test erwartet, der nach dem identischen experimentellen Prinzip abläuft. Gleichzeitig war der Test – gemessen an der Aussagekraft - sehr zeit-intensiv, da neuere Geräte, die eine Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschluss im Durchflußverfahren messen (z.B. VyCell Analyzer) nicht zur Verfügung standen.

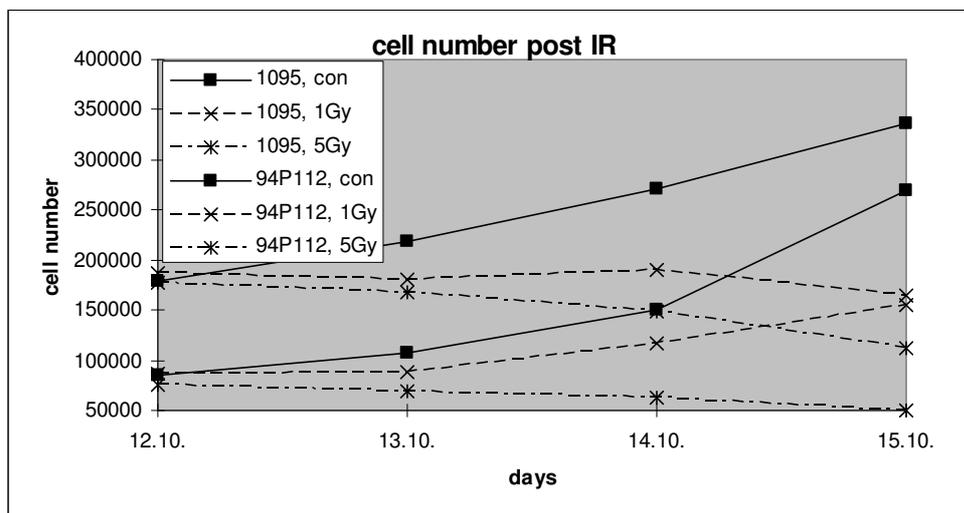


Abb. 1 Zellzählung durch Ausschluß des Vitalfarbstoffs Trypanblau. Bis zu 96 Std. nach Bestrahlung mit 1 Gy und 5 Gy wurden im Hämocytometer die überlebenden Zellen der lymphoblastoiden Linien 1095 (Wildtyp) und 94P112 ($Nbs1^{-/-}$) gezählt.

Eine alternatives, durchflußzytometrisches Verfahrens (exemplarische Daten siehe Abb. 2) unter Ausnutzung des zellulären Ausschlusses von Propidiumjodid wurde verwendet und soweit standardisiert, dass eine verlässliche Diskriminierung strahlensensitiver von strahlenresistenten Zellen möglich war. Zunächst wurde anhand von strahlen-sensitiven AT-Zellen, die mit dem TEL1-Hefehomolg des ATM-Gens komplementiert worden waren, der zeitliche Verlauf der Apoptose-Induktion untersucht.

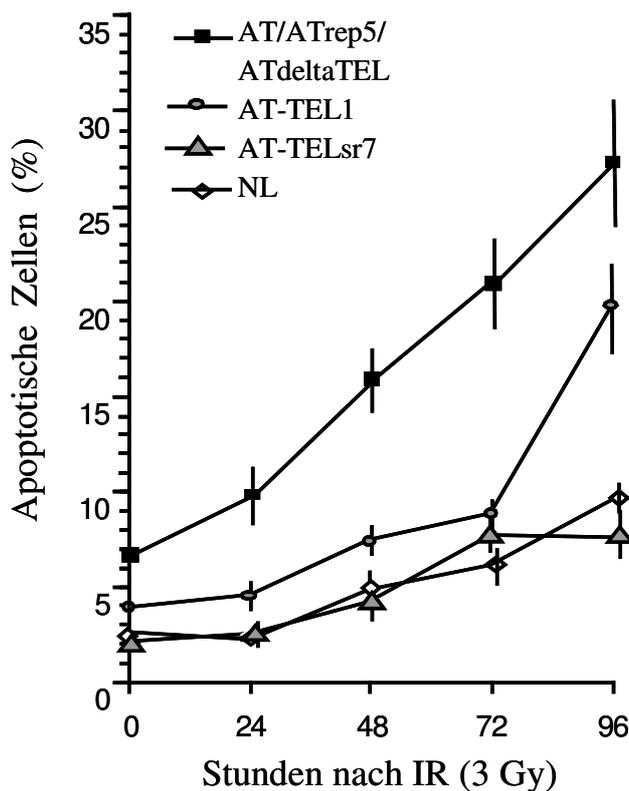


Abb. 2: Die Induktion der Apoptose durch Ausschluß von Propidiumjodid wurde untersucht in strahlensensitiven A-T-Zellen (AT/ATrep/ATdeltaTEL) sowie deren TEL1-komplementierten Derivate At-TEL und normalen GM637-Zellen.

Die Abbildung reflektiert deutlich die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit anhand der Apoptoseinduktion, insbesondere wird aber deutlich, dass Apoptose als Endpunkt zu späten Zeiten nach Bestrahlung stark ansteigt und somit erst nach einigen Tagen eine optimale Diskriminierung zwischen strahlenresistenten und –sensitiven Zellen ermöglicht.

Im folgenden Experiment wurde daher mit demselben Verfahren die Dosis-Abhängigkeit der Apoptose-Induktion nach 4 Tagen in verschiedenen ATM- und NBS1-defizienten Lymphoblasten untersucht (Abb. 3).

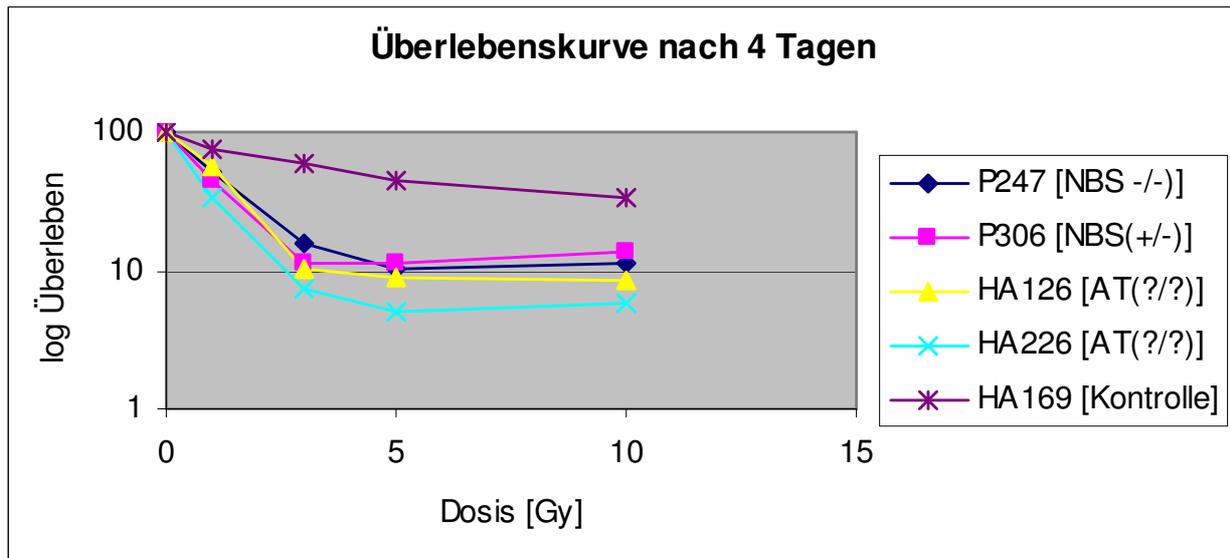


Abb. 3. Zellzählung (mit Propidiumjodid-Ausschluss): Kontrollzellen (HA 169) zeigen eine deutlich erhöhte Strahlenresistenz im Vergleich zu Zellen mit mutierten ATM (kodierte Proben) oder NBS-Genen. Heterozygote Träger von ATM- und NBS-Mutationen sind hier nicht deutlich von homozygoten Patienten unterscheidbar.

Ein weiteres Problem bei der Analyse der Strahlenempfindlichkeit anhand der Vitalfärbung und Zellzählung liegt darin, dass zu frühen Zeitpunkten (1-3 Tage) nach Bestrahlung keine deutlichen Unterschiede zwischen resistenten und sensitiven Zellen auftreten, v.a. nach Bestrahlung mit geringen Dosen. Durch Bestrahlung „abgetötete“ Zellen nehmen erst spät Trypanblau oder Propidiumiodid auf, während früh-apoptotische Zellen mit intakter Zytoplasmamembran im diesen Test als „lebende“ Zellendetektiert werden. Bei den später verwendeten primären Blutzellen lymphoblastoiden Ursprungs müssen jedoch frühe Zeitpunkte nach Bestrahlung gewählt werden, da die Zellen nicht replizieren, und eine geringe Dosis sollte appliziert werden. Gleichzeitig sollte bei diesen Zellen ein hoher Prozentsatz nach Bestrahlung in die Apoptose gehen (im Unterschied z.B. zu Fibroblasten). Wir haben daher aus der Summe der genannten Gründe auf die FACS-basierende Methode der Messung von zellulären Apoptose-Parametern (z.B. Annexin V) umgestellt, was eine gut standardisierte Messung erlaubt.

1.2. Etablierung verschiedener FACS-basierender Apoptose-Tests (AnnexinV (Pharmingen), DNA Fragmentierungs Assay (Pharmingen), Apo2.7 (Immunotech), Caspase-3 (Pharmingen))

Unter Apoptose versteht man einen genetisch sehr komplex regulierten („programmierten“) Zelltod, der insbesondere in bestrahlten Lymphozyten auftritt (Abb. 4).

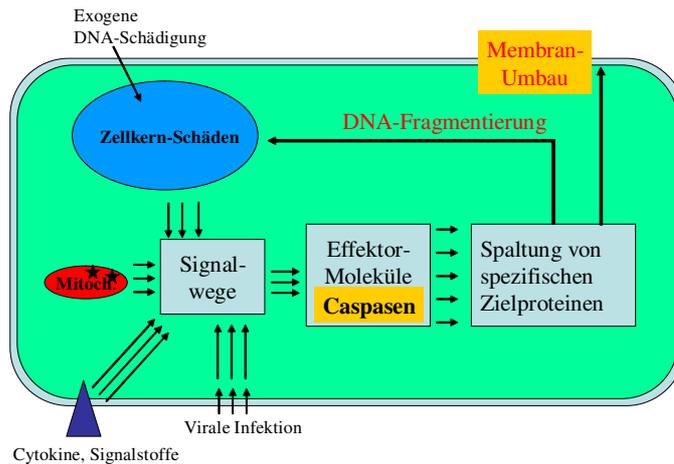


Abb. 4: Schema der Apoptose

Es gibt verschiedene Nachweisverfahren für Apoptose, deren Eignung für unsere Fragestellung in Vorversuchen ausgetestet wurde – alle Verfahren sind Standardverfahren und in Fachzeitschriften publiziert. Gesucht wurde nach einem Verfahren, das bei möglichst geringen Strahlendosen (< 1 Gy) einen deutlichen Unterschied zwischen strahlensensiblen und resistenten Zellen nachweisen lässt. Als wenig geeignet, da nicht genügend sensitiv für unsere Fragestellung, erwies sich der APO-BrdU Assay, durch den die im Verlauf von Apoptose entstehende DNA-Fragmentierung (wie sie in gelelektrophoretischer Auftrennung als „DNA ladder“ sichtbar würde) durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Sehr sensitiv hingegen waren Nachweise, die mit fluoreszenz-markierten Antikörpern arbeiten, welche die Aktivierung von Schlüsselproteine der Apoptose nachweisen (Aktivierung von Caspase3, einem essentiellen Faktor der Signalkaskaden der Apoptose), bzw. dem Nachweis des für apoptotische Zellen typischen Umbaus der Zellmembran mit AnnexinV: AnnexinV ist ein Protein von ca. 35 kD, das abhängig von Ca^{2+} an Phospholipide bindet und besonders grosse Affinität zu Phosphatidylserin besitzt, einem Bestandteil der inneren Plasmamembran. Im Verlauf der Apoptose wird die

Zytoplasmamembran umgebaut und Phosphatidylserin wird nach aussen gelagert, so dass AnnexinV daran binden kann. Es ist mit FITC (*Fluorescein Isothiocyanat*) konjugiert, so dass die grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen im FACS spezifisch nachgewiesen werden können. Durch gleichzeitige Färbung mit Propidiumjodid (PI) können tote (nekrotische) Zellen detektiert werden, die aufgrund ihrer defekten Plasmamembranen PI nicht mehr ausschliessen können. (Abb. 5).

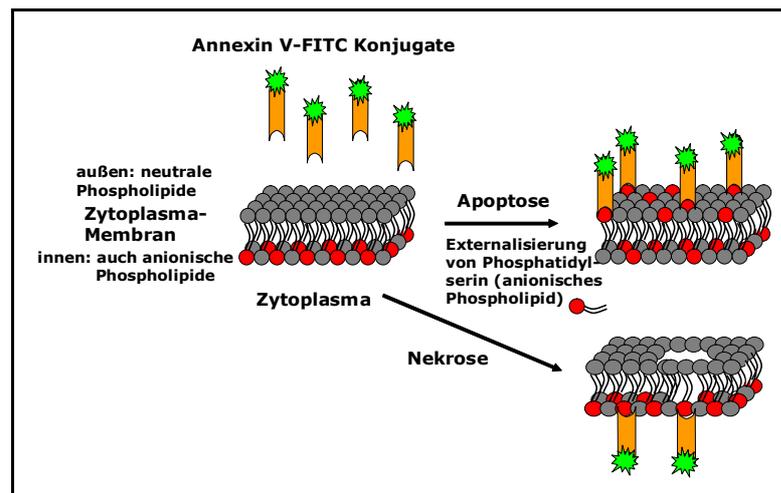


Abb. 5: Nachweis von apoptotischen Membranveränderungen, durch die Phosphatidylserin aus der inneren in die äussere Schicht umgelagert wird, durch Anlagerung von AnnexinV-FITC Konjugaten. Bei Nekrose finden diese Umlagerungen nicht statt, hingegen entstehen Störungen (als „Loch“ dargestellt) in der äusseren Membran, so dass Farbstoffe wie Propidiumjodid einströmen können.

Die Messung der strahlen-induzierten Apoptose mit dem AnnexinV-Test erfasst folglich die Zytoplasmamembran-Schädigungen der apoptotischen (und auch der spät nekrotischen) Zellen. Die Messung nach 0, 2, 4, 6 Gy Bestrahlung verlief in verschiedenen etablierten Zelllinien hoch reproduzierbar im Sinne einer Zeit- und Dosis-Abhängigkeit. Die in 12 Stunden-Intervallen gemessenen Fraktionen apoptotischer Zellen zeigt bis etwa 72 Stunden nach Bestrahlung einen (dosis-abhängigen) Anstieg bei gleich bleibendem Basalwert. Erfreulicherweise konnte mit diesem System auch eine homozygot NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrom)-mutierte lymphoblastoide Zelllinie von ihrer parentalen, heterozygot mutierten Zelllinie, aufgrund der erhöhten Strahlenempfindlichkeit unterschieden werden (Abb. 6). Zudem kann dieser Test mit einer sehr geringen Zellzahl durchgeführt werden: Pro Messpunkt werden nur 100.000 - 150.000 Zellen benötigt.

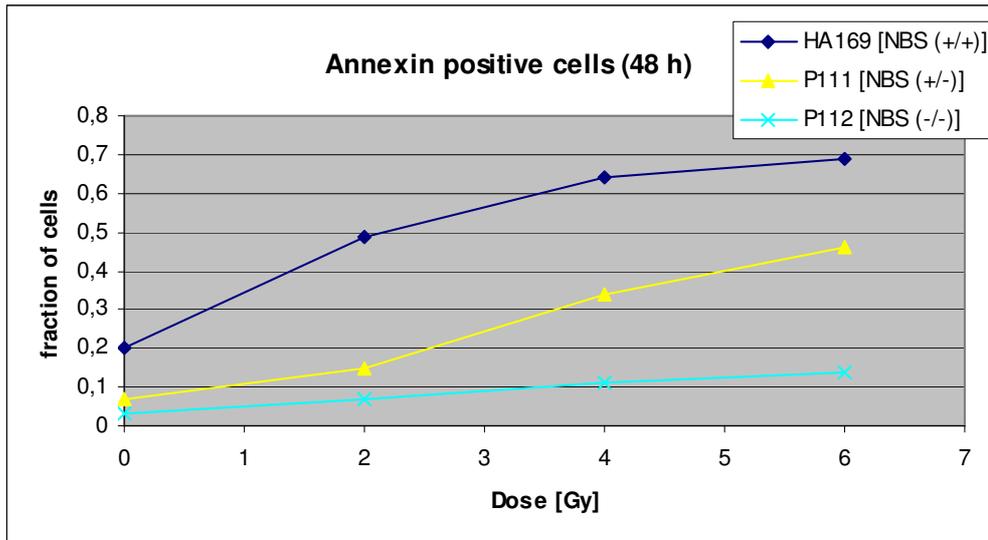


Abb. 6. Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Apoptose, gemessen 48 h nach Bestrahlung mit dem AnnexinV-Test, in den lymphoblastoiden Zelllinien HA 169 (NBS^{+/+}), P111 (NBS^{+/-}) und P112 (NBS^{-/-}). P111 und P112 stammen aus einer Familie, HA 169 ist eine nicht-isogene Wildtyplinie.

In einem analogen Experiment wurden Zellen getestet, die durch Überexpression des Rekombinationsproteins Rad51 strahlenresistenter gemacht wurden. Es wurde hier die Behandlung mit Etoposide, einem DSB-induzierenden Agens, als Ersatz für die ionisierende Bestrahlung verwendet. Das Ergebnis zeigt wiederum, dass die Detektion von Annexin an der äußeren Zytoplasmamembran als verlässliches Kriterium der zellulären Strahlenresistenz (hier ersetzt durch Etoposide) angewendet werden kann (siehe Abb. 7)

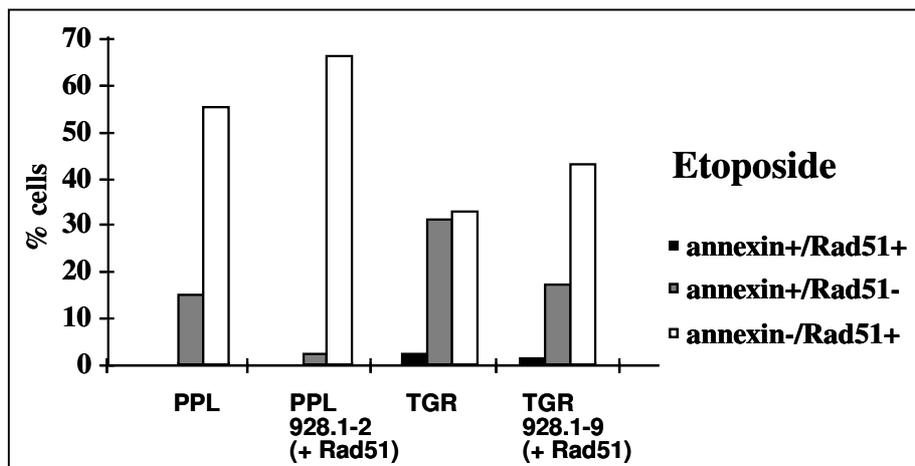


Abb. 7 : Primäre (PPL) und immortalisierte (TGR) Nagerzellen, in denen das Rad51-Protein überexprimiert wurde, wurde im Annexin-Test auf apoptotische Zellen nach Behandlung mit Etoposid sowie Präsenz des Rad51-Proteins getestet. Überexpression von Rad51, und somit wahrscheinlich eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität, reduziert die Apoptose nach Induktion von Doppelstrangbrüchen.

Anmerkung zum weiteren Vorgehen: Auf die Verwendung des im ursprünglichen Antrag genannten Tests auf Sub-G1-Zellen wurde verzichtet. Statt dessen wurde eine Anzahl weiterer, hoch spezifischer Apoptose-Verfahren anhand der etablierten Zelllinien getestet:

Der DNA Fragmentierungs Assay verläuft nach dem Prinzip des ‚TUNEL labelling‘ und detektiert die DNA-Strangbrüche, die durch apoptotisch induzierte, endogene Proteasen produziert werden. Dieser Test benötigt sehr viele Zellen (etwa 10^6 pro Meßpunkt). Er zeigte zwar mit verschiedenen Zelllinien eine Zeit- und Dosisabhängige Induktion der Apoptose, die aber nur sehr geringe absolute Werte erreichte. Der Test scheint für eine Standardisierung und Anwendung an den limitierten primären Blutzellen daher nicht sinnvoll.

Der Apo2.7-Test detektiert ein mitochondriales Membranprotein (38 kDa), welches spezifisch in apoptotischen Zellen exponiert wird. Auch mit diesem Test, der nur geringe Zellzahlen benötigt, konnten NBS1^{-/-}-Zellen 48 Stunden nach 2Gy und 5Gy als strahlenüberempfindlich i. Vgl. zu ihren heterozygoten Kontrollen erkannt werden. Darüberhinaus waren menschliche Leukämiezelllinien (HL60) mit überexprimiertem p53-Protein strahlen-resistenter als ihre Kontrollen, was sich mit dem Ergebnis anderer Arbeitsgruppen deckt.

Auch mit dem Caspase-3-Test konnte in diversen Zelllinien eine eindeutige Apoptose-Induktion nach ionisierender Bestrahlung, sowie nach UV-Bestrahlung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Test ist aber deutlich Zeit- und kostenaufwendiger als z.B. der AnnexinV-Test.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass sich für weitere Analysen der AnnexinV- und der Apo2.7-Test als besonders geeignet herausgestellt haben. Beide Assays kommen mit geringen Zellzahlen aus und differenzieren zwischen strahlenresistenten und –sensitiven Zelllinien (z.B. einer homozygot und einer heterozygot mutierten lymphoblastoiden Nbs1^{-/-} bzw. Nbs1^{+/-} Zelllinie, sowie weitere Test-Zelllinien).

1.3. Analyse des Zellzyklus

Die Messung der DNA-Verteilung (Zellzyklus) zeigte in den als Laborstandard verwendeten Jurkat-Zelllinien einen sehr schönen G1- und zeitlich versetzten G2-Block nach Bestrahlung. Das Auftreten eines strahlen-induzierten G2-Blocks war auch in strahlenresistenten bzw. -sensitiven Derivaten von AT-Zellen sehr schön nachweisbar, entsprechend der Datenlage in der Literatur. Überraschenderweise zeigte jedoch die durch TEL1-Überexpression strahlenresistent gewordene Zelllinie AT-TEL keine Veränderung des Zellzyklusverhaltens nach Bestrahlung, insbesondere keinen ‚Gewinn‘ des G1-Blocks nach Bestrahlung (siehe Abb. 8, 9) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Regulation des Zellzyklus nach Bestrahlung nicht immer ein wesentlicher Faktor in der Ausprägung der zellulären Strahlenresistenz sein muss.

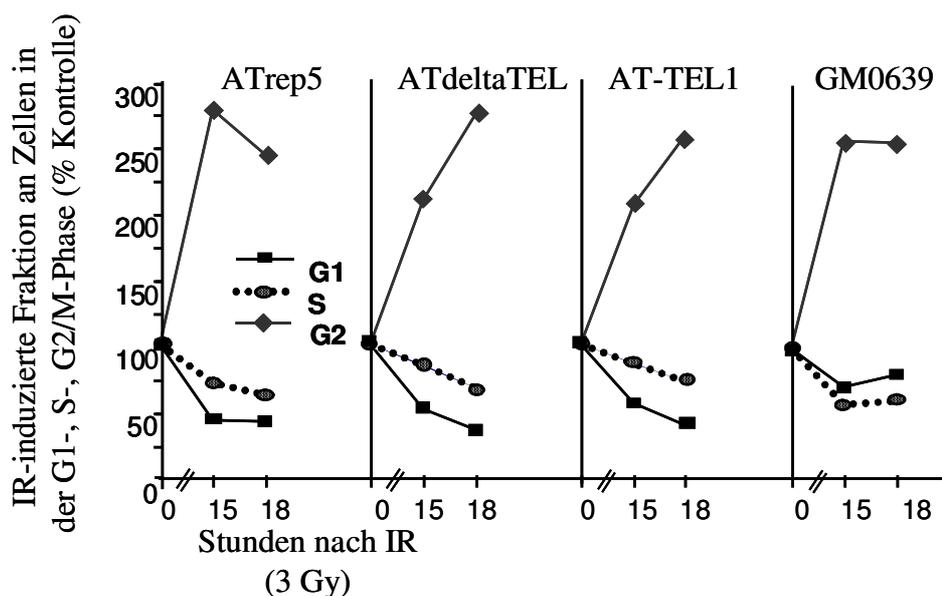


Abb. 8: AT-Zellen und TEL1-komplementierte Derivate wurden bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten die Zellzyklusphasen in bivariaten FACS-Experimenten (Einbau von BrdU) bestimmt. Der G2-Block nach Bestrahlung wird in allen Zellpopulationen ausgeprägt, während der G1-Block (ersichtlich aus dem reduzierten Anteil an Zellen in der S-Phase, die nicht aus G1 weiter in den Zyklus eingehen) in den strahlensensitiven AT-Zellen, wie auch den strahlenresistenten Derivaten AT-TEL fehlt. Im Unterschied dazu sieht man einen deutlichen Verlust an S-Phase-Zellen, bei nur schwach erniedrigten G1-Zell-Gehalt, in den GM 639 Kontroll-Zellen. Die Effekte dieser Zellzyklusanalyse sind deutlich schwächer als in primären Zellen, da durch die SV40-Immortalisierung der hier verwendeten Zelllinien die Zellzyklusregulation in G1 reduziert wird. (genauere Detail siehe Cao et al, 2001).

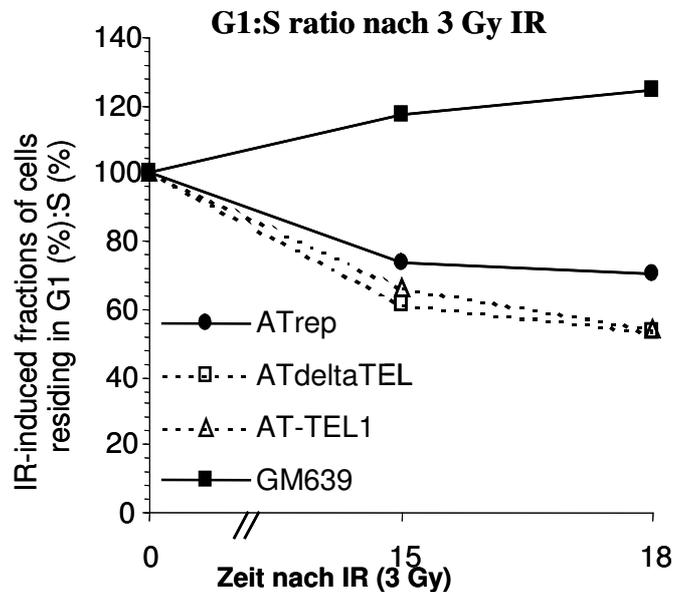


Abb. 9: (wie oben, Abb. 8): AT-Zellen und TEL1-komplementierte Derivate wurden bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten die Zellzyklusphasen in bivariaten FACS-Experimenten (Einbau von BrdU) bestimmt. Zur besseren Differenzierung des G1/S-Übergangs wurden hier die Zellpopulationen in G1 und S als Verhältnis dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den AT und normalen GM639-Zellen.

In lymphoblastischen NBS-Zelllinien war die Zellzyklusregulation nach IR nur schlecht reproduzierbar, was wohl auf die homozygote bzw. heterozygote NBS-Mutation zurückzuführen ist (siehe entsprechende Literatur). In etablierten menschlichen HL60-Leukämiezellen war der strahlen-induzierte G2-Block hingegen ausgeprägt zu erkennen (Daten nicht gezeigt), auch in Abhängigkeit des überexprimierten p53-Proteins. Diese Inkonsistenzen zwischen verschiedenen Zelllinien – unabhängig vom Phänotyp der Strahlenempfindlichkeit – liess eine weitere Analyse der Zellzyklusverteilung für die primären Blutzellen nicht sinnvoll erscheinen. Insbesondere auch die Tatsache, dass die primären Blutzellen nach Auftauen nicht PHA-stimulierbar waren (siehe spätere Ergebnisse), bestätigten die Einschätzung, dass Zellzyklus-Analysen in den primären Blut-Zellen zwar Zeit-, Personal- und Materialaufwendig, aber wissenschaftlich nicht sinnvoll sind.

1.4 Messung der Mikrokerne

Die Messung der Mikrokerne zeigte in den verwendeten AT- und Nbs1-Zelllinien eine sehr gute Dosisabhängigkeit der Induktion nach Bestrahlung. Darüberhinaus waren strahlensensitive Zellen (NBS homozygot mutiert) mit diesem System gut detektierbar. Auch heterozygote Träger einer NBS-Mutation zeigten – zumindest nach Bestrahlung – eine erhöhte Induktion an Mikrokerneln verglichen mit normalen Wildtypzellen (siehe Abb. 10).

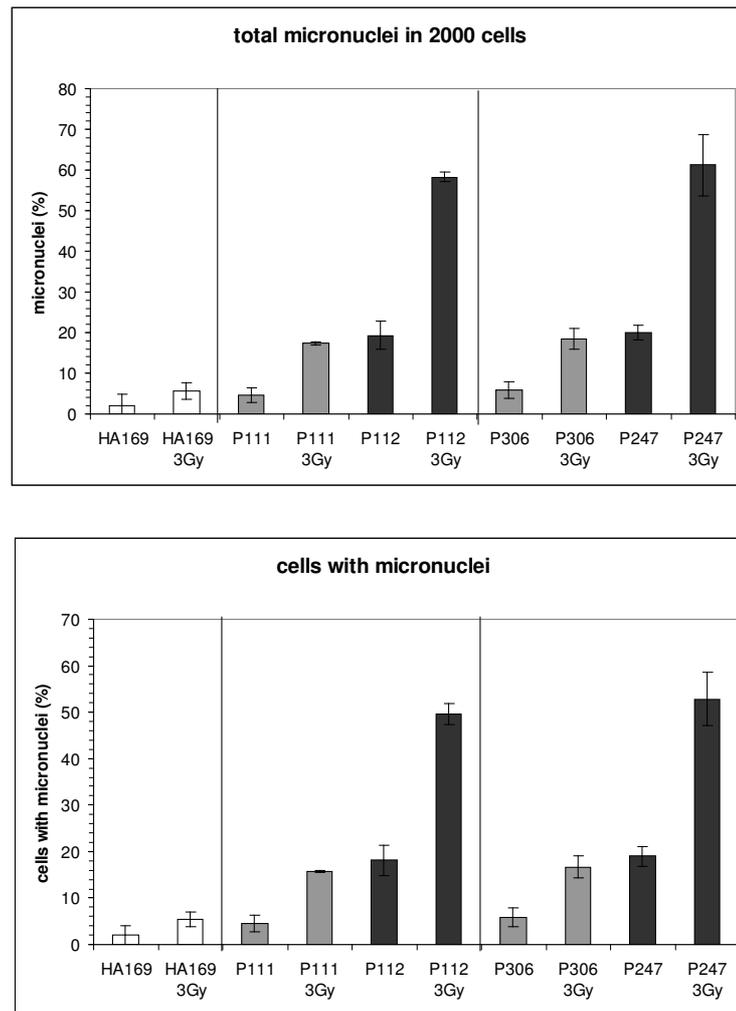


Abb. 10 FACS-basierende Analyse der Mikrokerne in den unbestrahlten und mit 3 Gy bestrahlten lymphoblastoiden Zelllinien HA169 (NBS^{+/+}), P111 und P247 (NBS^{+/-}) und P112 und P306 (NBS^{-/-}). Dargestellt ist der Anteil der Zellen (%) mit Mikrokerneln.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und frühere Erfahrungen unseres Kooperationspartners Dr. Nüsse (GSF-Zytometrie) deuten jedoch darauf hin, dass die Messung der Mikrokerne ausschließlich in etablierten, gut proliferierenden Zellsystemen – wie sie hier getestet wurden- aussagekräftige Daten bzgl. der Strahlenreaktion liefert.

1.5. Analyse der Chromosomenaberrationen

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit korreliert in der Regel sehr gut mit dem Auftreten strahlen-induzierter chromosomaler Schäden („Aberrationen“) in proliferierenden Zellen. Diese sind in ihrer Gesamtheit zum Beispiel durch klassische Analyse der Chromosomenaberrationen in Metaphase-Präparaten, nach Giemsa-Färbung der DNA, erkennbar und auswertbar. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Proliferation durch mindestens eine S- und G₂/M-Phase nach Bestrahlung.

In dem bereits beschriebenen Zellkulturmodell der strahlensensitiven und der durch TEL1 komplementierten AT-Zellen konnte die reduzierte zelluläre Strahlenempfindlichkeit der AT-TEL1-Zellen gut mit einer reduzierten Häufigkeit strahlen-induzierter Chromosomenaberrationen korreliert werden (Abb. 11). Die durch TEL1-Expression reduzierten, aber nicht ganz vollständig komplementierten Chromosomenaberrationen zeigen ein intermediäres Verhalten zwischen den strahlensensitiven AT-Zellen und normalen Wildtyp-Kontrollen (GM637), in guter Übereinstimmung mit den Daten zum klonogenen Überleben bzw. der Apoptose-Induktion nach Bestrahlung.

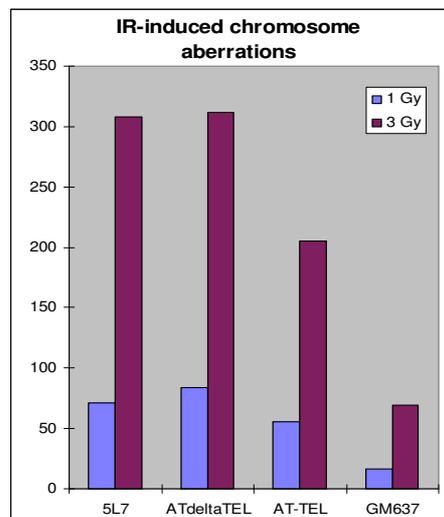


Abbildung 11: Logarithmisch wachsende AT-Zellen, deren mit TEL1-komplementierten Derivate sowie normale GM537 Wildtyp-Kontrollen wurden mit 1 Gy oder 3 Gy bestrahlt und 16 Stunden nach Bestrahlung Metaphase-Zellen präpariert. Pro Zelllinie und Dosis wurden mindestens 100 Metaphasen auf kodierten Objektträgern (doppelt blind) ausgewertet.

Interessant ist hierbei noch einmal die Tatsache, dass die Induktion chromosomaler Aberrationen – zumindest in diesem genetisch definierten und kontrollierten Zellsystem – besser mit zellulärer Strahlenempfindlichkeit korreliert, als es für die strahlenabhängige Regulation des Zellzyklus der Fall ist.

In analogen Experimenten wurden die bereits beschriebenen Rad51-überexprimierenden Mäuserzellen auf chromosomale Aberrationen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung untersucht (Abb. 12). Hier wurden 16 Stunden nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen verschiedene Aberrationen vom Chromosomen- und vom Chromatidtyp untersucht. Es zeigt sich, dass auch hier die reduzierte zelluläre Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Bestrahlung (bzw. hier konkret die reduzierte Apoptose-Induktion nach Behandlung mit dem DSB-induzierenden Agens Etoposide, welche als Ersatz für die ionisierende Bestrahlung beim Endpunkt ‚Apoptose‘ verwendet worden war) mit einer reduzierten Induktion chromosomaler Aberrationen nach IR korreliert. Dies ist insofern erstaunlich, da offensichtlich auch ‚gesunde‘ Wildtyp-Zellen durch Überexpression eines Proteins (hier Rad51) eine zusätzlich gesteigerte Resistenz gegen IR aufweisen können. Diese spiegelt sich wieder in der reduzierten Apoptose nach DSB-Behandlung, sowie hier spezifisch in der reduzierten Anzahl der Aberrationen vom Chromatid-Typ. Die reduzierte Induktion chromosomaler Aberrationen vom Chromatidtyp, nicht aber der Aberrationen vom Chromosomentyp, ist ein sehr starkes Indiz dafür, dass der protektive Effekt des überexprimierten Rad51-Proteins in der S-Phase auftritt. Dieses Verhalten ist mit einer Reparaturfunktion des überexprimierten Rad51-Proteins im Zuge der Homologen Rekombination in der S-Phase erklärbar, also eine Situation in welcher die zeitliche und räumliche Nähe der (entstehenden) Schwesterchromatiden zu homologen Rekombinationsprozessen genutzt werden kann. Neuere Untersuchungen haben in der Tat gezeigt, dass homologe Rekombination – und vor allem auch spontane Rekombination in ungeschädigten Zellen - in Säugerzellen präferentiell in der S-Phase auftreten sollte. Hier treten zum Beispiel spontane Einzelstrangbrüche andauernd auf, die im Zuge des weiteren Fortschreitens der Replikationsgabel zu Doppelstrangbrüchen führen. Diese werden offensichtlich präferentiell unter Ausnutzung der Schwesterchromatiden durch Homologe Rekombination repariert.

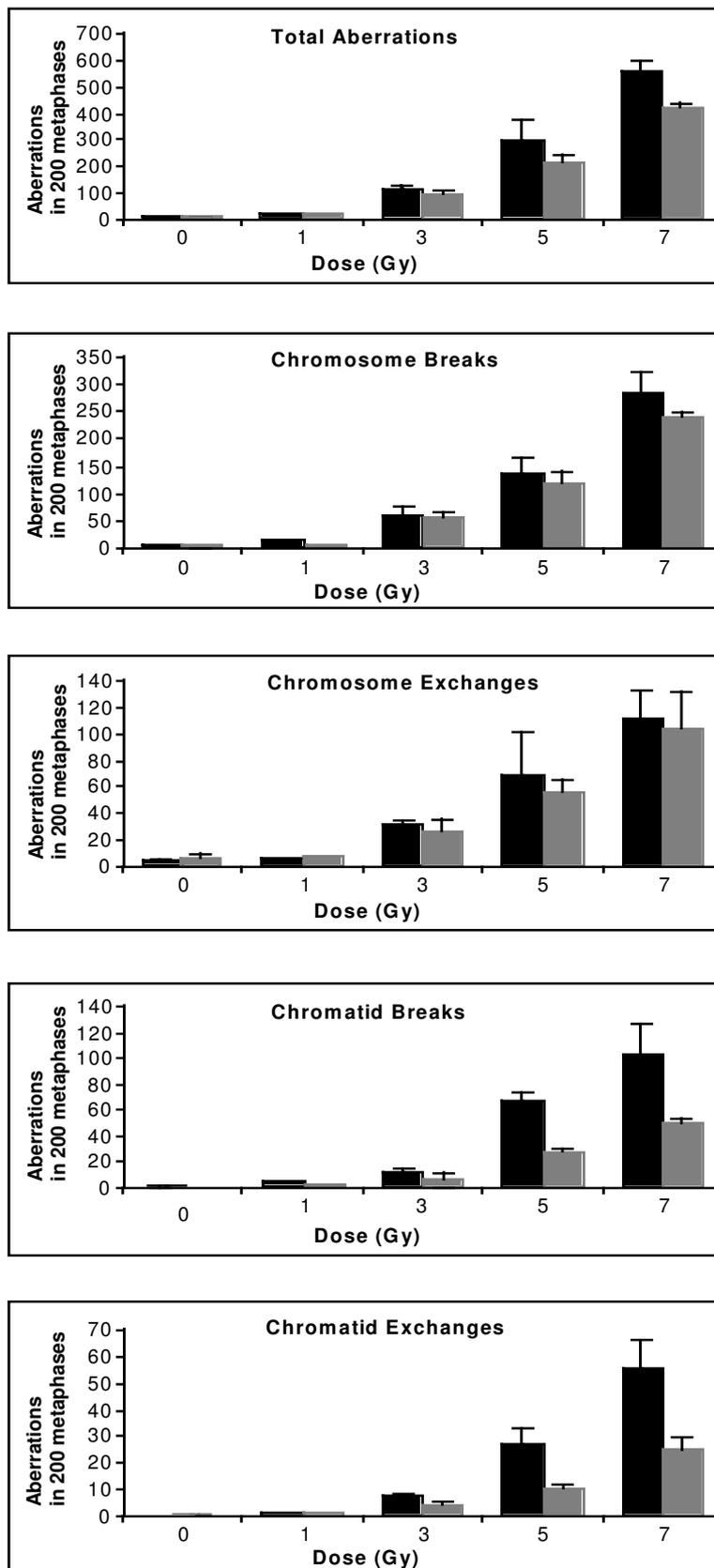


Abbildung 12: Rad51-überexprimierende (Grau) und Kontroll-Nagerzellen (Schwarz) wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt und 16 Stunden nach Bestrahlung Metaphasen präpariert. Pro Zelllinie und Dosis wurden mindestens 200 Metaphasen auf kodierten Objektträgern (doppelt blind) ausgewertet und die Aberrationen klassifiziert nach Chromosomentyp- bzw. Chromatidtyp-Aberrationen.

Die Anwendung der Chromosomenanalysen auf lymphoblastiide Zellen wird hier exemplarisch anhand der homozygot und heterozygot NBS-mutierten Zelllinien gezeigt (Abb. 13). Anhand von 2 immortalisierten Zellpärchen – jeweils von einem homozygot NBS1-mutierten Patienten sowie einer heterozygoten Kontrolle der selben Familie – zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit strahleninduzierter chromosomaler Aberrationen vom Genotyp, also dem NBS1-Status der Zellen. In Analogie zu den zellulären Empfindlichkeits-Studien (Zellzahl, Apoptose, Überleben) sind die homozygot mutierten Zellen deutlich strahlensensitiver als die heterozygoten Kontrollen. Erstaunlicherweise sind aber auch die heterozygot mutierten Zellen sensitiver als Wildtyp-Kontrollen (HA169), was wiederum eine Haploinsuffizienz des NBS1-Proteins in den heterozygot mutierten Zellen nahelegt.

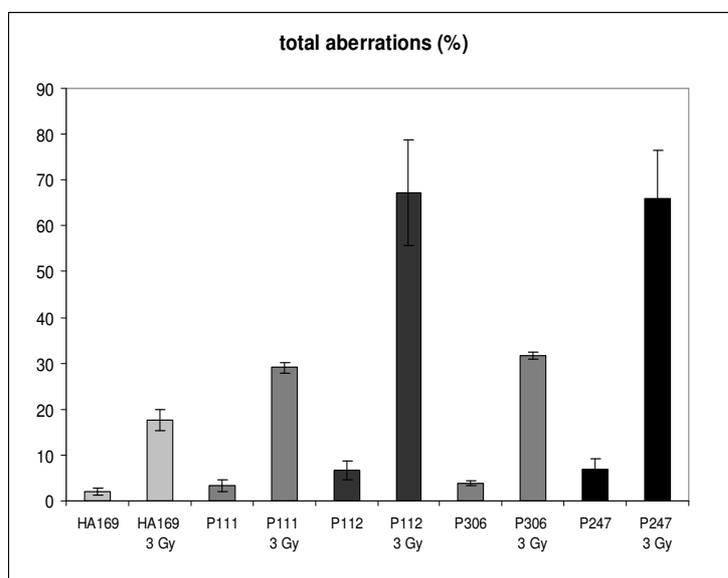


Abbildung 12: Zellen mit homozygoten NBS1-Mutationen (P112, P247) sowie deren heterozygoten Familien-Kontrollen (P111, P306) und normale Kontroll-Lymphoblasten (HA169) wurden mit 3 Gy bestrahlt und 16 Stunden nach Bestrahlung Metaphasen präpariert. Pro Zelllinie und Dosis wurden mindestens 200 Metaphasen doppelt blind ausgewertet

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Phänotyp strahlen-induzierter chromosomaler Aberrationen ausgezeichnet mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit (gemessen in klonogenem Überleben (hier nicht gezeigt), Zellzahl oder Apoptose-Induktion) korreliert. Dies gilt überraschenderweise nicht nur für erhöhte Strahlenempfindlichkeit durch Mutation eines oder beider Allele eines DNA-Reparatur- oder verwandten Proteins, sondern auch für den protektiven Effekt eines überexprimierten (Reparatur)-Proteins auf normale Wildtypzellen. Essentielle Voraussetzung zur Messung diesen Phänotyps ist jedoch die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach Bestrahlung, um eine genügende Anzahl auswertbarer Metaphasen zu bekommen.

1.6. Optimierung und Anwendung des alkalischen Comet Assay

Einzel- und Doppelstrang-Brüche der DNA (SSB und DSB) entstehen einerseits endogen (bzw. spontan) im Rahmen der physiologischen Vorgänge des DNA-Metabolismus. Sie werden außerdem exogen hervorgerufen durch Behandlung der Zellen mit clastogenen (d.h. DNA brechenden) Chemikalien, die z.B. häufig in der Tumorthherapie eingesetzt werden, und nach Bestrahlung. DSB sind vergleichsweise selten, aber sie haben sehr weitreichende funktionelle Konsequenzen, wenn sie nicht oder falsch repariert werden. Sie gelten als eine von mehreren Ursachen für genomische Instabilität, die sich u.a. in erhöhter Häufigkeit von Chromosomenaberrationen äussern und als eines von mehreren Merkmalen von Tumoren angesehen werden.

Für Routine-Untersuchungen der Analyse von DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen und deren Reparatur ist der alkalische Comet Assay geeignet, bei dem Einzelzellen bei geringen Dosen (4 Gy) bestrahlt und untersucht werden können (Standardverfahren, siehe z.B. die Internetseite <http://comet.itrcindia.org/>). Alle Analysen wurden im Institut für Strahlenhygiene des BfS (Leitung Dr. T. Jung) mit der dortigen experimentellen Ausrüstung und Software für die Auswertung durchgeführt, und unter Nutzung der entsprechenden langjährigen Fachkompetenz. Ein Ablaufschema des Assays ist in Abb. 14 gezeigt.

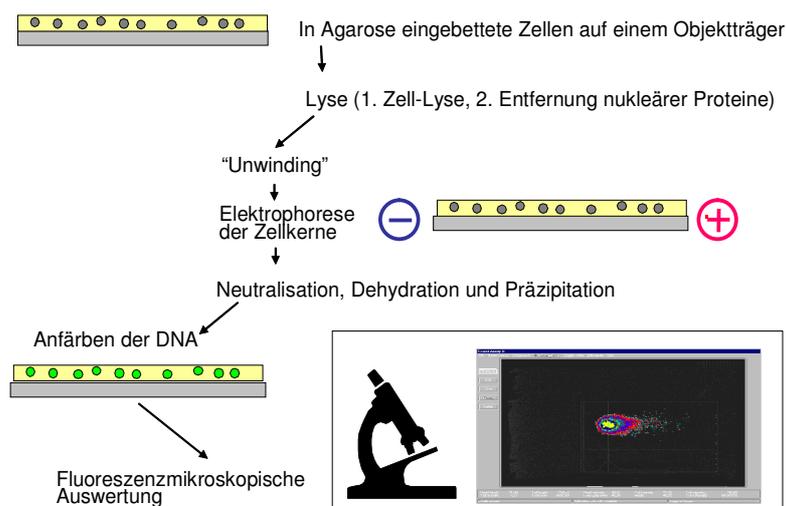


Abb. 14 Ablauf-Schema des Comet Assay

Vor der Auswertung (System Tilfortronics) wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt, so dass nur morphologisch „gesunde Zellen“ berücksichtigt wurden.

Ausgewertet wurde das sog. *Tail-Olive Moment* (TOM), bei dem die Distanz vom Zentrum des Comet-Kopfes bis zum Schwanz-Massen-Zentrum („Länge des Schweifs“), multipliziert mit der Fraktion an DNA im Schwanz („relativer DNA-Gehalt im Schweif“) berechnet wird (siehe Abb. 15 wie auch hierzu die Internetseite <http://comet.itrcindia.org/definitions.htm>).

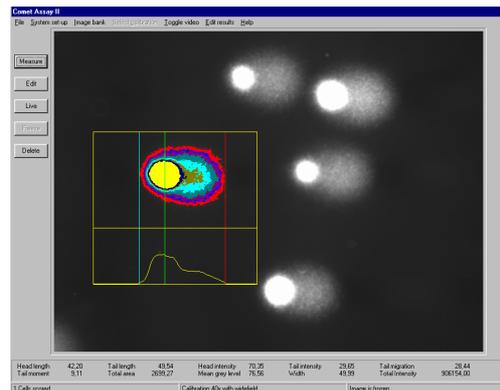


Abb. 15 „Cometen“ und ihr Auswerte-Verfahren

Daraus kann die DNA-Reparatur-Kapazität berechnet werden als relativer Anteil ungeschädigter Zellen (TOM < 100) nach Bestrahlung:

$$\text{DNA-Reparatur-Kapazität (\%)} = \frac{\% \text{ ungeschädigte Zellen (bestrahlt)} \times 100}{\% \text{ ungeschädigte Zellen (unbestrahlt)}}$$

Die Stärke der Schädigung jeder Zelle kann durch den Vergleich der Schadensklassen ermittelt werden (Abb. 16), in welcher die Verteilung der Schadens-Stärke in der Gesamtpopulation der Zelle aufgetragen wird.

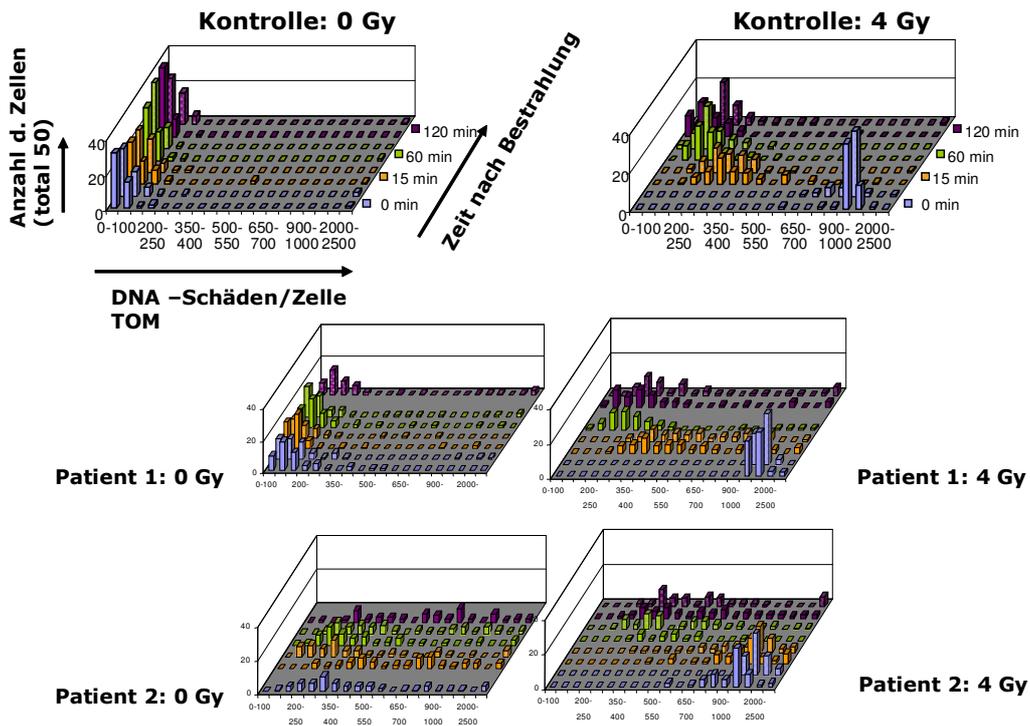


Abb. 16 Darstellung der DNA-Schäden/Zelle (TOM) als Schadensklassen ohne /mit Bestrahlung (0 und 4 Gy) sowie nach 0, 15, 60 und 120 min Reparatur (obere Reihe). Es ist ersichtlich, dass für ungeschädigte Kontrollzellen TOM < 100 ist, und dass nach Bestrahlung bei einem hohen Anteil der Zellen TOM > 1000 sein kann. Durch Reparatur reduziert sich der Anteil der Zellen mit hoher Schädigung fast bis zum Kontrollniveau. Patient 1 reagiert ähnlich wie die Kontrollperson, wenn auch nach Reparatur ein etwas erhöhter Anteil von Zellen mit stärkerer Schädigung („Restschaden“) zurückbleibt (mittlere Reihe). Die Zellen von Patient 2 haben bereits ohne Bestrahlung ein sehr hohes Schadensniveau, was experimentell bedingt sein kann (Einfrieren/Auftauen der Zellen) oder evtl. auf vorhergehende Chemotherapie zurückgeführt werden kann. Auch deren Reparaturkapazität ist wesentlich schlechter als die der Kontrollperson (untere Reihe).

Die Anwendung des *Comet Assay* unter Begleitung des BfS-IfS zeigte bei allen verwendeten Zelllinien eine gute Induktion der initialen DNA-Schäden (DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche) nach Bestrahlung sowie eine nahezu komplette Reparatur der Strahlenschäden 15 min. oder spätestens 30 min. nach Bestrahlung. Die Analyse homo- bzw. heterozygot mutierter NBS1-Zelllinien sowie von Zellen mit unterschiedlichem p53-Status zeigte hier keine eindeutigen Unterschiede in der DNA-Reparatur, was mit der Datenlage aktueller publizierter Berichte anderer Gruppen übereinstimmt (Abb. 17).

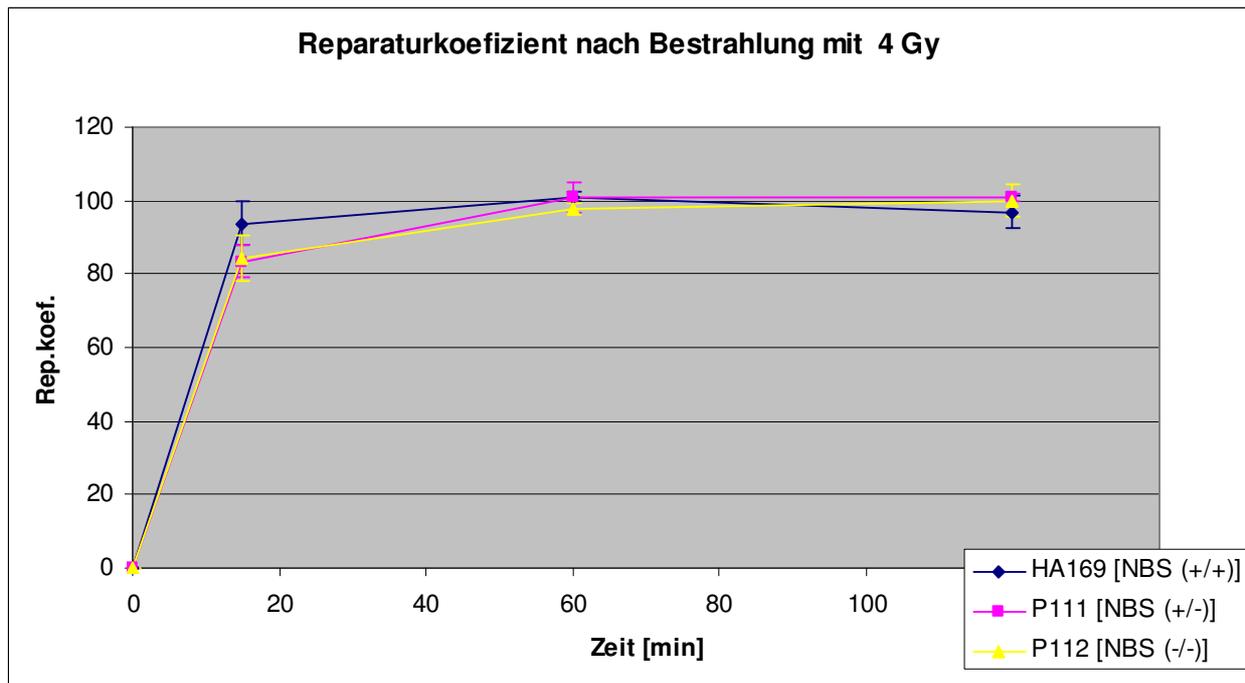


Abb. 17 In den lymphoblastoiden Zelllinien HA169 (NBS^{+/+}), P111 (NBS^{+/-}) und P112 (NBS^{-/-}) wurde der Reparaturkoeffizient nach einer Bestrahlung mit 4 Gy und Reparaturzeiten von 15, 60 und 120 min (bei Raumtemperatur) über der Zeit (min) aufgetragen. Es wurde in mehreren Versuchen reproduziert, dass sich die Linien in ihrem Reparaturverhalten nicht unterscheiden.

1.7. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) zum Nachweis von DNA Doppelstrangbrüchen und ihrer Reparatur

Es gibt verschiedene Techniken, um DNA Doppelstrangbrüche nachzuweisen. DSB können durch PFGE nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Technik der **Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)** ist im IMS etabliert, und sie wurde für die Charakterisierung des Reparaturverhaltens strahlensensibler Säugerzelllinien auch erfolgreich eingesetzt. Für die NBS^{+/-} und NBS^{-/-} Zelllinien (P111 und P112) ergab sich jedoch der überraschende Befund, dass bei PFGE Analysen nach γ -Bestrahlung keine Unterschiede im Reparaturverhalten nachzuweisen waren (A.A. Friedl, unveröffentlicht). Dieser Befund weist (1) auf die komplexen Ursachen von Strahlenempfindlichkeit hin und (2) darauf, dass nicht zwingend ein Defekt in der DSB-Reparatur vorliegen muss. Ein Nachteil von PFGE liegt in den hohen Strahlendosen (80 bis 100 Gy), der enorm großen Anzahl benötigter Zellen und dem für Routineuntersuchungen insgesamt zu hohen Arbeitsaufwand. Die Analyse der Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen mittels Pulsfeld-

Gelelektrophorese erwies sich daher als ungeeignet für unsere Fragestellung. Erstens wegen der sehr hohen Bestrahlungsdosen (80 Gy und höher), und fernerhin bestätigte sich der bereits mit dem Comet Assay erhobene Befund, dass homo- und heterozygot mutierte Nbs1-Zellen kein unterschiedliches Reparaturverhalten zeigen.

1.8 Immuncytologischer Assay für 8oxo-dGuanin (mit Rubikon AG)

Es gibt Gründe anzunehmen, dass oxidative Schäden in der DNA, insbesondere oxidiertes Guanin, 8oxo-dGuanin (8oxoG), einen Beitrag zu erhöhter Strahlenempfindlichkeit leisten. Wenn diese Schäden nicht erkannt und entfernt werden, besitzen sie ein hohes mutagenes Potential, das Grundlage für eine Disposition für Krebs sein kann. Daher war ursprünglich beabsichtigt, einen sensitiven Test für 8oxoG zu etablieren. Beabsichtigt war eine Zusammenarbeit mit der Firma Rubikon AG, die Interesse hatte, den von ihr entwickelten

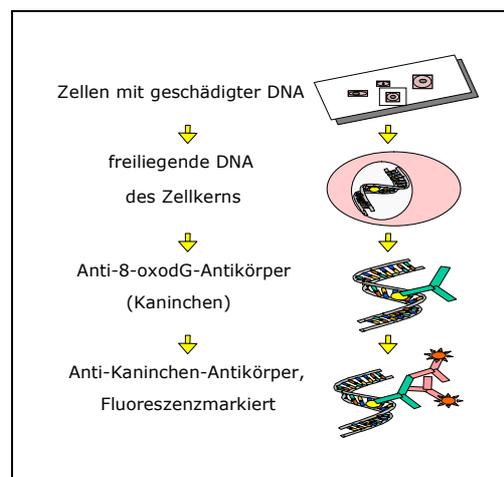


Abb. 18 Schema des Immuncytologischen Assays ICA der Firma Rubikon AG zur Detektion von strahleninduziertem 8-oxo-dGuanin in DNA

Immuncytologischen Assay (,ICA') auf seine Sensitivität zur Detektion von strahleninduziertem 8oxoG auszutesten. Der Test-Kit wurde kostenneutral zur Verfügung gestellt; das Prinzip des Tests ist in Abb. 18 dargestellt.

Die Messung oxidativer DNA-Schäden durch den 8oxoG-Test konnte in unserem Labor nach H₂O₂-Behandlung der adhärenen Zellen A549 (Rubikon AG) erfolgreich durchgeführt werden. Das auf Fluoreszenz basierende Detektionssystem

wurde unter Verwendung von mindestens 10^6 Zellen durchflußzytometrisch durchgeführt. Es konnte weiterhin in mehreren Optimierungsschritten mit dem Laser Scanning Zytometer der AG Zytometrie auf Einzelzellebene etabliert werden, so daß für dieses Testsystem lediglich etwa 10.000 Zellen pro Meßpunkt benötigt werden. Ein weiterer Schritt in der Etablierung der Methode für Suspensionszellen (lymphoblastoide Linien als Modell für Blutzellen) gelang unter Verwendung definierter Cytospin-Zentrifugationsschritte für H_2O_2 -induzierte oxidative Schäden. Trotz erfolgreicher Optimierung des Testsystems auf weniger Versuchszellen sowie Anwendung an lymphoblastoiden Zellen nach H_2O_2 -Behandlung erwies sich der Test als nicht genügend sensitiv, strahleninduzierte oxidative Schäden reproduzierbar nachzuweisen. Es bestand der Verdacht, dass der von der Rubikon AG zur Verfügung gestellte Antikörper gegen 8oxoG nicht genügend spezifisch ist, so dass wir weitere Versuche abbrechen. Bisher gibt es keine kostengünstigen Antikörper anderer Firmen, so dass wir diese Methode nicht weiter verfolgt haben. Wir folgern, dass mit diesem Testsystem beim momentanen Stand der Entwicklung keine verlässlichen Aussagen zur zellulären Strahlenempfindlichkeit zu treffen sind. Als Alternative gehen wir momentan den Versuch an, den Comet Assay mit 8-oxoG-spezifischen Endonukleasen (z.B. Fpg) zu koppeln.

2. Arbeiten mit den klinischen Zell-Proben

2.1. Erste Anwendung der Testsysteme an primären Blutzellen

2.1.1 Mit dem AnnexinV-Test konnte auch in primären Blutzellen eine sehr schöne Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Es zeigte sich hier, daß schon der Dosisbereich von 0-3 Gy ausreicht, um hohe Raten apoptotischer Zellen zu messen. Allerdings verdeutlichte die Zeitabhängigkeit, dass 48 Stunden nach Bestrahlung der Hintergrund unbestrahlter, apoptotischer Zellen schon stark ansteigt, so daß für die Anwendung an Patientenzellen der 24 Stunden-Wert als optimal erachtet wird. Darüberhinaus zeigte der Test keine Unterschiede in der strahlen-induzierten Apoptose nach Einfrieren/Auftauen der primären Zellen. Dieses Testsystem ist somit auch für primäre Blutzellen etabliert.

2.1.2 Der Comet Assay an primären Zellen aus Kontroll-Donoren zeigte, wie auch in den Zelllinien, die Induktion und Reparatur der DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung. Auch dieses Testsystem ist somit für primäre Blutzellen etabliert.

2.1.3 Bevor die Blutzellen aus dem Patientenblut isoliert wurden, wurde ein Aliquot abgezweigt für die Analyse chromosomaler Aberrationen nach Bestrahlung. Diese Blutproben wurden nach einem Standardverfahren (Standardprotokoll der AG Zytologie des GSF-IMS) kultiviert, unter Zugabe von PHA (Phyohämagglutinin), einem Wirkstoff der primäre Blutzellen für einige Replikationsrunden zur Proliferation *in vitro* stimuliert. Die so stimulierten Zellen wurden wie üblich bestrahlt und Metaphasenpräparate zur Auswertung chromosomaler Aberrationen angelegt. Bei den Blutproben der Leukämepatienten konnte dieses Verfahren keine nennenswerte Anzahl auswertbarer Metaphasen hervorbringen, die eine grobe Analyse – geschweige denn eine statistisch absicherbare Analyse mit genügender Stichprobenanzahl – ermöglichte. Trotz mehrfacher Auswertungs-Versuche konnten somit keine Daten zu chromosomalen Aberrationen bei den Leukämie-Patienten erhoben werden. Diskussionen mit Klinikern haben später ergeben, dass die Blutzellen von Leukämepatienten in der Regel offensichtlich zu stark geschädigt sind, um die Proliferation *in vitro*, nach Bestrahlung, einer genügend großen Anzahl von Zellen zu ermöglichen. Gleichzeitig wurden Berichte publiziert, die Defizienzen in der

PHA-Stimulierbarkeit bei Zellen von AT- und/oder NBS-Patienten aufzeigten. Obwohl die Chromosomenaberrationen eine exzellente Korrelation mit zellulärer Strahlenempfindlichkeit bei den (immortalisierten) Zelllinien ergaben, stand dieser Test also für die Anwendung bei primären Blutzellen aus Leukämiepatienten nicht zur Verfügung. Die Anwendung dieses Tests bei den später kultivierten Blutzellen des LUCY- und KORA-Kollektivs scheiterte aufgrund der Tatsache, dass die Projektlaufzeit der hierfür verantwortlichen durch das BMBF finanzierten chinesischen Mitarbeiter nicht verlängert wurde.

Der ‚Verlust‘ dieses Testverfahrens wurde durch die stark verbesserten und aufwendigeren Apoptose-Tests mit den klinischen Blutproben (Standardisierung durch Gegenfärbung, siehe nachfolgende Absätze) bzgl. des Arbeitsaufwandes kompensiert.

2.2. Überblick über den Versuchsablauf mit klinischen Proben

Folgende klinischen Materialien standen zur Verfügung:

70 Leukämie-Patienten (Probennahme vor und nach Ganzkörperbestrahlung)

30 Patienten des Klinikums Großhadern

40 Patienten des Klinikums Regensburg

24 junge Lungentumor-Patienten (LUCY Studie)

60 Kontrollpersonen (KORA S2000 Studie)

1 Kontrollperson für interne Standard-Kontrolle

Nach den ausführlichen Vorversuchen mit den Zelllinien und primären Blutzellen wurde die Entscheidung getroffen, dass nach *in vitro* Bestrahlung der Lymphozyten von Patienten und Kontrollpersonen das Apoptoseverhalten mit dem Annexin V-Test und das Reparatur-Verhalten mit dem Comet Assay untersucht werden soll. In Abb. 19 ist die Logistik der experimentellen Durchführung, die eine enge Zusammenarbeit mit den Kliniken erforderte, dargestellt.

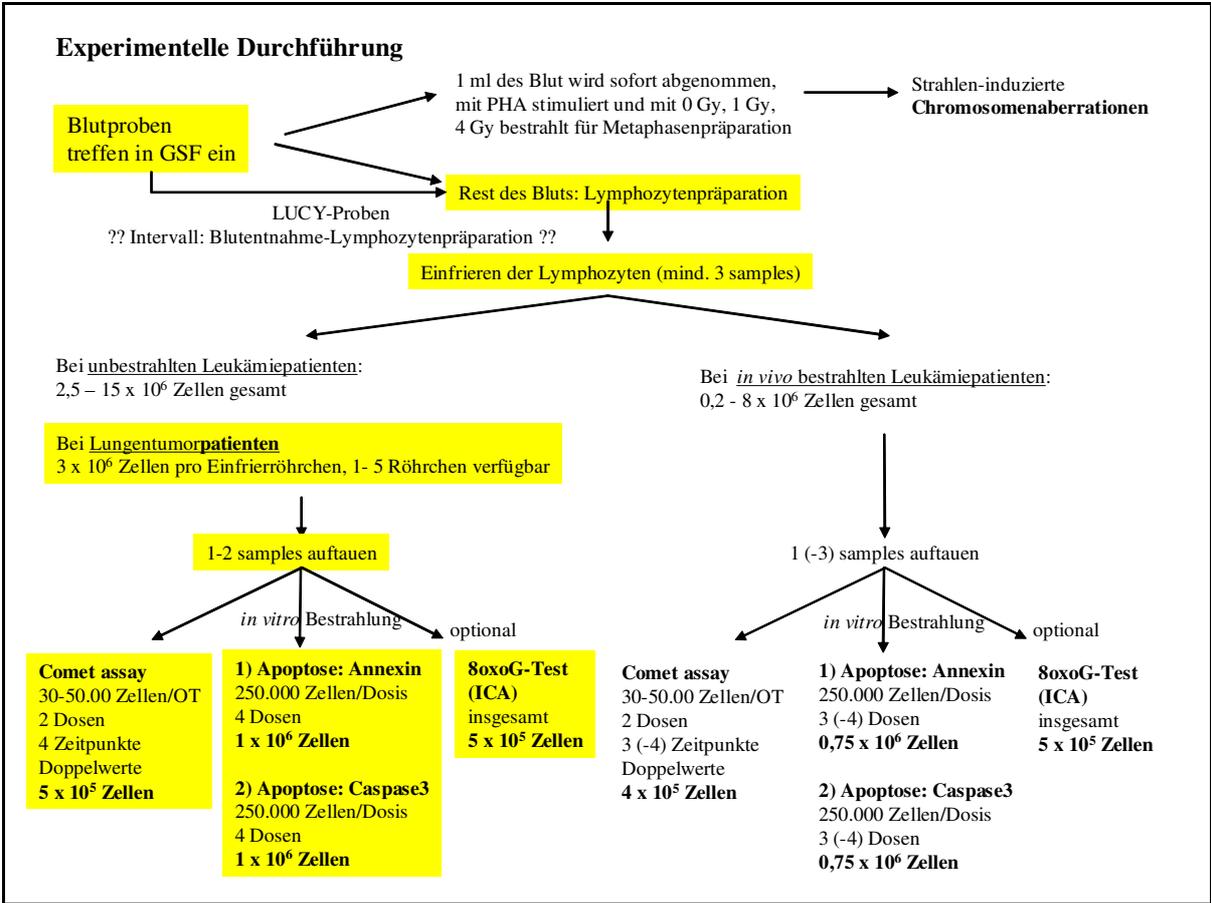


Abb. 19 Flussdiagramm der ursprünglich geplanten Versuchsdurchführung für Proben der Leukämie- und Lungentumor-Patienten sowie der Kontrollpersonen (KORA S2000).

Die zentrale Fragestellung des Projektes lautete, ob strahlensensitive Individuen aufgrund zellulärer Parameter erkannt werden können, die durch *in vitro* Bestrahlung von Blut (Lymphozyten) der betroffenen Personen zu ermitteln sind. Aus diesem Grund war die Korrelation der zellulären Daten mit den klinischen Befunden für das Kollektiv der Leukämiepatienten besonders wichtig, und zwar unter Berücksichtigung der akuten Strahlenreaktionen, die durch einen Fragebogen erfasst wurden, als auch im Rahmen einer Studie über die 5jährige Nachversorgung. Diese langfristig geplante Korrelations-Analyse ist in Abb. 20 als Übersichtsdiagramm dargestellt:

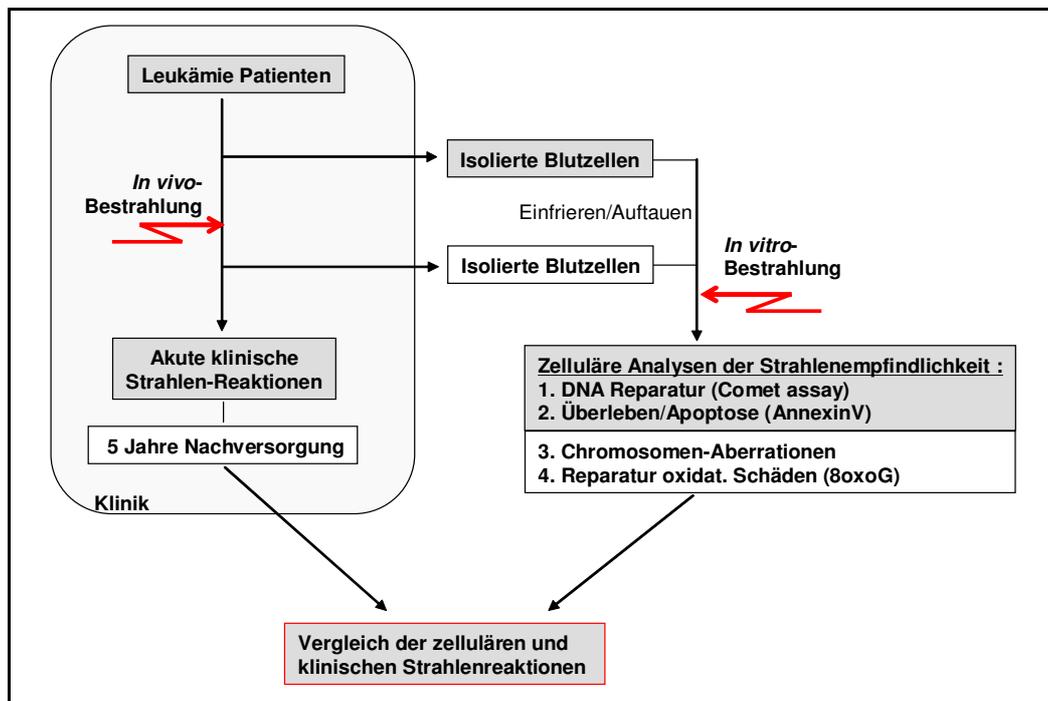


Abb. 20 Übersicht über die Korrelation der Analysen der Strahlenempfindlichkeit isolierter *in vitro*-bestrahlter Lymphozyten mit den akuten und langfristigen klinischen Strahlenreaktionen der Leukämie-Patienten. Weiss unterlegte Kästchen bezeichnen Analysen, die aus verschiedenen Gründen (noch) nicht durchgeführt werden konnten oder deren Durchführung nach den Vorversuchen nicht sinnvoll erschien.

2.3. Erzielte Ergebnisse

2.3.1 Standardisierte Präparation der Blutzellen aus Patientenblut

Bei der Etablierung der auf Durchflusszytometrie basierenden Apoptose-Tests für die Patienten-Zellmaterialien zeigte sich, dass die aus Patienten-Blut isolierten Lymphozyten stark heterogen sind und zelluläre Subpopulationen enthalten, die die durchflusszytometrische Auswertung der für B- und T-Lymphozyten spezifischen Apoptose stark erschweren. Diese Subpopulationen, die aus vielen sehr kleinen Zellen bestehen, waren besonders gross in den Präparationen der zur Verfügung gestellten Blutzellen der Lungentumor-Patienten. Sie waren aber auch in den von uns selbst isolierten Lymphozyten der Leukämiepatienten zu finden, wenn auch in geringerer Menge. Hingegen treten diese Subpopulationen in den nach demselben Protokoll isolierten Lymphozyten eines gesunden Spenders vor Ort (Standardkontrolle) kaum auf. Offenbar finden sich diese kleinzelligen Subpopulationen in den Proben der Tumorpatienten entweder krankheitsbedingt, oder/und sie entstehen aufgrund der Tatsache, dass die Proben von Tumorpatienten bedingt durch die unterschiedlichen Transportbedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Probenentnahme (bis zu max. 16 Stunden) aufgearbeitet wurden. Es war zu vermuten, dass die Subpopulationen kleiner Zellen in der Hauptsache abgestorbene Granulozyten, aber keine B- oder T-Zellen darstellen, die als Folge der verzögerten Probenaufbereitung der Tumorzellen entstehen.

Um dies zu beweisen, wurden daher in Kooperation mit dem Hämatologischen Labor (Klinikum der TU München) aus vier verschiedenen Blutproben isolierte Lymphozyten immunologisch charakterisiert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen charakteristische Oberflächenproteine wurden unterschiedliche Blutzell-Subpopulationen mit FACS-Analysen differenziert: B- und T-Lymphozyten (durch CD3 und CD19 Antikörper), Granulozyten (ggf. auch abgestorben) und Monozyten (durch CD14 Antikörper), alle Leukozyten (durch CD45 Antikörper). Es zeigte sich, dass sich in den Lymphozytenpräparationen, bei denen die Auswertung der Apoptose durch die zahlreichen kleinen Zellen gestört war, vermehrt Granulozyten und Erythrozyten fanden. Wenn möglich, wurde daher auf möglichst kurze Transportzeiten und effiziente Aufarbeitung der Blutproben hingearbeitet, und das Einfrieren erfolgte nach streng standardisiertem Protokoll.

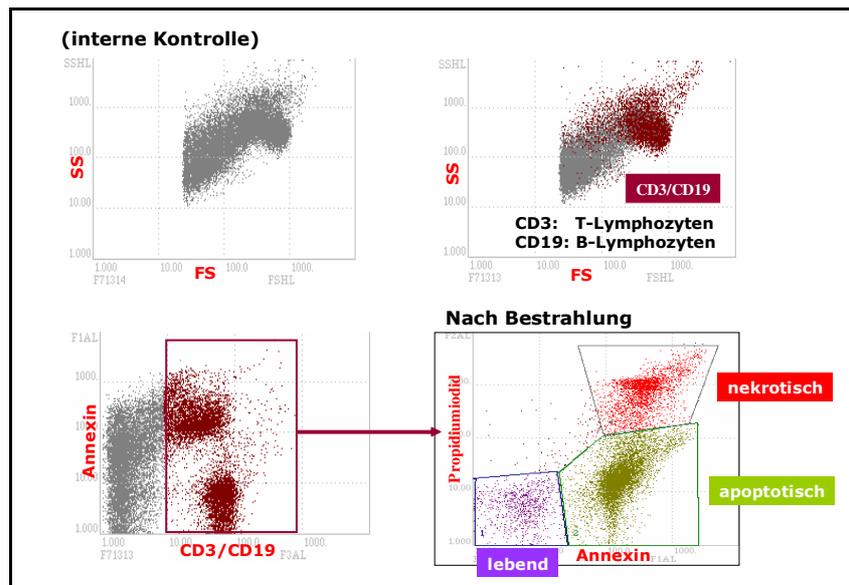


Abb. 21 Standardisierung der Zellpopulation durch CD3/CD19 Markierung der B- und T-Zellen für den Apoptose-Nachweis (AnnexinV/Propidiumjodid) mittels FACS

Als entscheidende Verbesserung und Standardisierung der Experimente an unterschiedlichem Probenmaterial wurden die FACS-Analysen der Apoptose, mittels AnnexinV/PI und Caspase3-Nachweis, erweitert durch die gleichzeitige CD3/CD19 Erkennung der B- und T-Lymphozyten (Abb. 21).

2.3.2. Analyse der Apoptose *in vitro*-bestrahlter Lymphozyten aus Blutproben

Bei den Voruntersuchungen der primären Lymphozyten von gesunden Personen und Leukämie-/Lungentumor-Patienten ergab sich, dass die kombinierte Erfassung toter (PI-positiv) und apoptotischer (Annexin/Caspase3-positiv) Zellen denselben Kurvenverlauf ergibt wie die Messung apoptotischer Zellen alleine, wobei alle Messpunkte bis zu maximal 15% erhöht sind. Das Absterben der bestrahlten Lymphozyten ist somit, wie es beschrieben wurde, bei diesem experimentellen Ansatz überwiegend auf Apoptose zurückzuführen.

Mit dem Caspase3-Test liessen sich nach Bestrahlung im Gegensatz zum AnnexinV-Test keine genügend deutlichen Unterschiede bei der strahleninduzierten Apoptose in den Patientenzellen zeigen. Daher wurde dieser Test durch den Apo2.7-Test, ebenfalls einem FACS- basierenden Test, ersetzt. Apo2.7 bindet an ein mitochondriales 38 kDa Membranprotein (7A6 Antigen), das in Zellen, die in Apoptose gehen, stark exprimiert wird. Apo 2.7 ist ein früher Bestandteil der molekularen Signalkaskade der Apoptose. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser beiden unab-

hängigen Apoptose-Tests (AnnexinV und Apo2.7) sehr gut vergleichbar, so dass im weiteren, aus Gründen geringerer Kosten und besserer Reproduzierbarkeit des AnnexinV-Tests, bei den meisten Materialien nur noch der AnnexinV/PI Test durchgeführt wurde.

Die isolierten Lymphozyten aller Tumor-Patienten und unauffälligen Kontrollpersonen (KORAS2000-Kollektiv) wurden mit 0,4 Gy und 0,8 Gy bestrahlt und nach 48 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels AnnexinV/PI im FACS in den unbestrahlten und bestrahlten Proben analysiert. Die spezifische CD3/CD19 Markierung der B- und T-Lymphozyten steigerte die Qualität und Reproduzierbarkeit der Analysen massgeblich. Eine weitere Optimierung der Methode wurde dadurch erreicht, dass in jeder Versuchsdurchführung die Lymphozyten einer einzigen Normalperson als interne Standardkontrolle parallel eingesetzt wurden. Diese Standardkontrolle erlaubt die Abschätzung der 95 % Konfidenz des Mittelwertes des jeweiligen Kollektivs (Tumorpatienten oder KORA S2000), und sie erlaubt im Einzelfall die Überprüfung, ob das jeweilige Experiment fehlerlos ablief. Diese Aussage wird besonders wichtig, wenn sich einzelne Proben finden, deren Apoptosewerte von denen der Gruppe deutlich abweichen, und die auf eine potentielle Strahlensensibilität des betreffenden Patienten hinweisen könnten. Durch die mitgeführte Standardkontrolle kann ermittelt werden, ob das Experiment störungsfrei verlief und ob „abweichende“ Proben real sind.

Die Fraktion der Zellen, die nach 48 Stunden strahleninduzierte Apoptose zeigen (vom prozentualen Anteil apoptotischer Zellen 48 Stunden nach Bestrahlung wurde der jeweilige Prozentanteil spontan auftretender apoptotischer Zellen aus der

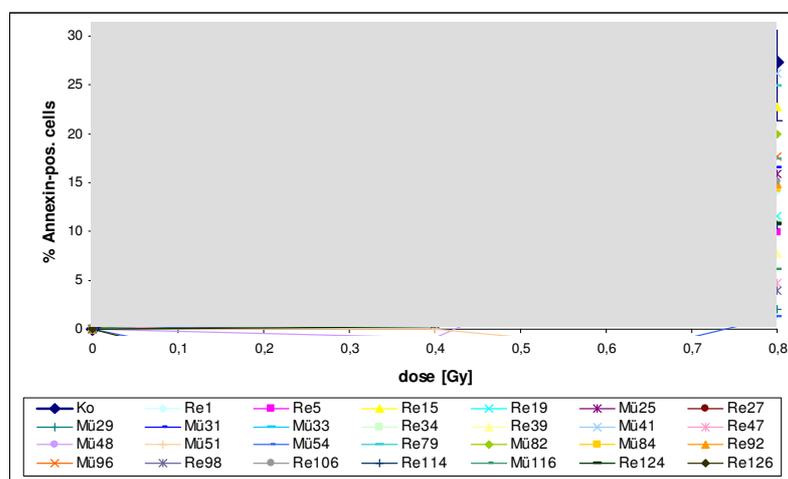


Abb. 22 Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Apoptose, nach Doppelfärbung mit CD3/CD19 Antikörpern und AnnexinV/PI. AnnexinV-positive, apoptotische Zellen von 27 Leukämiepatienten sind im Vergleich zur Vielfachanalyse der Standardkontrolle aufgetragen, deren Streuung durch die graue Schattierung dargestellt ist.

unbestrahlten Kontrolle abgezogen) wurde für alle Patientenproben über der Dosis aufgetragen, und zwar im Vergleich zu den jeweiligen Werten der Standardkontrolle (siehe beispielhaft Abb. 22).

Bei erstaunlich vielen Proben aus beiden Leukämiepatienten-Kollektiven (aus Regensburg und München) zeigte sich im Vergleich zur Standardkontrolle eine deutlich *reduzierte* strahleninduzierte Apoptose. Dieser Befund zeigte sich deutlicher für eine Dosis von 0,8 Gy als für 0,4 Gy. Es gab nur sehr wenige Fälle, bei denen offensichtlich eine *erhöhte* Apoptose nachzuweisen ist. Bei Zellen von 60 Testpersonen aus der KORA S2000 Studie, die als gesunde Individuen ohne vorherige Bestrahlung bezüglich ihrer Strahlenempfindlichkeit „normal“ sein sollten, wurden i. d. R. Werte gefunden, die in der Streuung der Einzelwerte der Standardkontrolle lagen (Einzeldaten nicht gezeigt, siehe aber Abb. 24). Auch bei den bislang 24 Blutproben der jungen Lungentumorpatienten (LUCY Studie) waren aus den experimentellen Rohdaten keine deutlichen Abweichungen von der Standardkontrolle zu bemerken.

Zusammenfassend lässt sich also aus einer vorläufigen Bewertung der experimentellen Analyse der strahleninduzierten Apoptose (bei 0 Gy, 0,4 Gy und 0,8 Gy; 48 h nach Behandlung analysiert) von Tumorpatienten und Normalpersonen sagen, dass

- (1) die Qualität der Messungen deutlich verbessert wurde, wenn eine Doppelfärbung für CD3/CD19 zur selektiven Detektion von B- und T-Lymphozyten und für apoptose-spezifische Marker (Caspase3, AnnexinV und Apo2.7) durchgeführt wurde;
- (2) der AnnexinV und Apo2.7 Assay in gleicher Weise geeignet sind für die Analyse der strahleninduzierten Apoptose von Blutproben, während der Caspase3 Assay weniger geeignet ist;
- (3) die Aussagekraft der Daten durch eine bei jeder Analyse mitgeführten Standardkontrolle (Blut derselben gesunden Person) deutlich verbessert wird;
- (4) aus den Rohdaten der Leukämiepatienten die Tendenz ersichtlich ist, dass die Fähigkeit zur strahleninduzierten Apoptose verringert ist, und zwar bei einigen

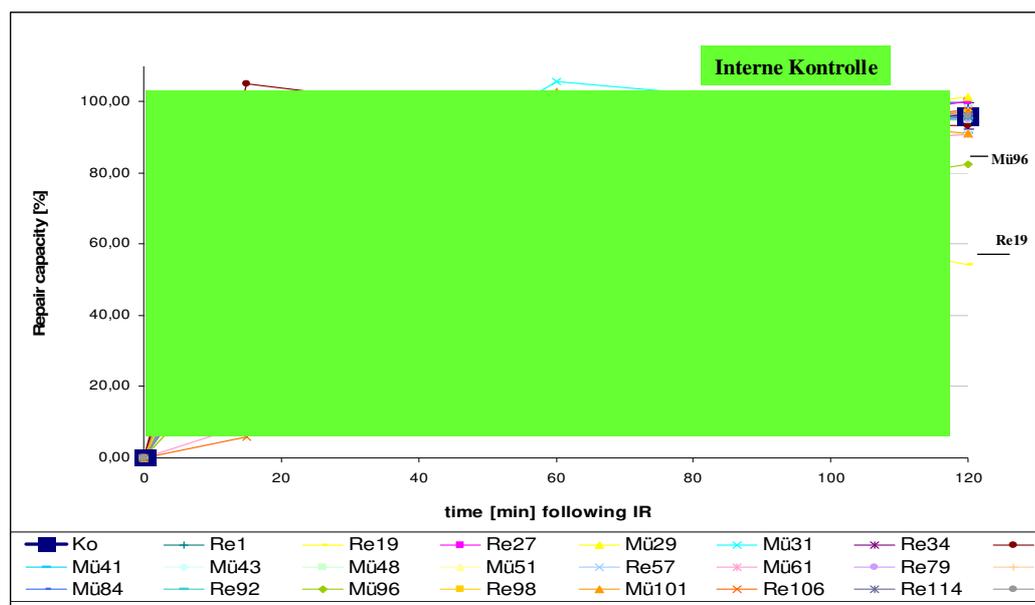
Proben sehr deutlich. Nur in wenigen Fällen tritt eine verstärkte Apoptose im Sinne einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit auf.

2.3.3. Analyse der DNA Reparaturkapazität *in vitro*-bestrahlter Lymphozyten aus Blutproben mit dem Comet Assay

Die Blutproben der Leukämiepatienten und der Kontrollpersonen (KORA S2000) wurden mit 4 Gy bestrahlt und für 0 min, 15 min, 60 min und 120 min zur Reparatur der Brüche bei Raumtemperatur belassen und nach dem dargestellten Prinzip im Comet Assay analysiert. Wie bei den Versuchen zur Apoptose wurde bei jedem experimentellen Ansatz eine Standard-Kontrolle (Blutprobe derselben gesunden Kontrollperson) mitgeführt, um ggf. Unregelmässigkeiten bei der Elektrophorese (die es durchaus gab) zu detektieren. Bei den isolierten Lymphozyten erbrachte die Bestrahlung mit 4 Gy eine gute Induktion von initialen DNA-Schäden. Eine deutliche Reparatur der Strahlenschäden war schon 15 min nach Bestrahlung zu bemerken, in der Regel war sie nach 1h nahezu vollständig. Im Unterschied zu den durchflusszytometrischen Tests ist die Auswertung der *Comet Assays* offenbar nicht anfällig für die beschriebene Zellheterogenität in Form von Subpopulationen kleiner Zellen (vermutlich Erythrozyten und Granulozyten). Die Gesamtheit der *Comet Assays* verschiedener Proben und verschiedener Experimente weist jedoch eine ziemlich hohe Schwankungsbreite auf. Innerhalb eines Experiments können aber die klinischen Proben eindeutig interpretiert werden aufgrund des konstanten Verlaufs der mitlaufenden Normal-Kontrolle.

Wie bereits früher erwähnt, konnte die in Aussicht gestellte automatische Messung, Dokumentation und Auswertung der Kometen-Schweife am Messplatz des IfS des BfS Neuherberg nicht rechtzeitig etabliert werden. Die konsequenterweise durchgeführte nicht-automatisierte Auswertung war daher sehr aufwändig, so dass die Zeit nicht ausreichte, um eine genügende Zahl von Blutproben der jungen Lungentumor-Patienten zu analysieren. Der erste Schritt der Auswertung der Analysen bestand in der Auftragung der Reparatur-Kapazität jeder Probe (Doppelbestimmungen für jeden Messpunkt) über der Zeit nach Bestrahlung. Bei Betrachtung der Reparaturkapazitäten wurde schnell ersichtlich, daß der 15 Minuten-

Wert starken Schwankungen ausgesetzt war, die bei den klinischen Proben sowohl unter als auch über den Werten der Standardkontrolle lagen. Diese Werte waren auch in der Standardkontrolle schwankend, so daß dieser frühe Zeitpunkt offensichtlich experimentell bedingten Schwankungen stark ausgesetzt ist, die nicht von biologischer Relevanz sein sollten. Bei der abschließenden Bewertung der Experimente wurde der 15-Minuten-Wert daher nicht berücksichtigt. Die Werte der einzelnen Messungen der Standardkontrolle zu den Zeitpunkten 60 und 120 Minuten nach Bestrahlung zeigen i.d.R. nur eine relativ geringe Schwankungsbreite, was für eine gute Standardisierung und Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente spricht. Unter den klinischen Proben fanden sich einige Proben, die verglichen mit der Standardkontrolle einen deutlich geringeren Reparaturkoeffizienten nach 60 bzw. 120 Minuten nach Bestrahlung aufweisen (Abb. 23). Diese Unterschiede sollten von biologischem Interesse sein.



$$\text{DNA-Reparatur-Kapazität (\%)} = \frac{\% \text{ ungeschädigte Zellen (bestrahlt)}}{\% \text{ ungeschädigte Zellen (Kontrolle)}} \times 100$$

Abb.23 Comet Assay: Die Reparaturkapazität (%), die sich ergibt aus dem Anteil ungeschädigter Zellen nach 4 Gy Bestrahlung und 0, 15, 60 bzw. 120 min Reparatur-Inkubation, verglichen mit dem Anteil ungeschädigter Zellen der unbestrahlten Kontrolle, ist über den Reparaturzeiten aufgetragen exemplarisch für 12 Leukämie-Patienten. Die Streuung der Standard-Kontrolle, die bei jedem Experiment mitgeführt wurde, ist durch die grüne Fläche dargestellt.

Die Auswertung war problematisch, wenn bereits die unbestrahlten Proben sehr hohe Schädigung zeigten. Auffällige Reparaturkoeffizienten die auf hoher

Schädigung der Proben bereits im unbestrahlten Zustand beruhen, werden daher wiederholt bzw. in ihrer Aussagekraft entsprechend vorsichtig interpretiert.

Zusammenfassend lässt sich also aus einer vorläufigen Bewertung der experimentellen Analyse der Reparatur strahleninduzierter Einzel- und Doppelstrangbrüche im Comet Assay (nach 0 Gy und 4 Gy, und nach 0 min, 15 min, 60 min und 120 min Inkubation nach Behandlung mit IR analysiert) von Tumorpatienten und Normalpersonen sagen, dass

- (1) die Messungen keine selektive Detektion von B- und T-Lymphozyten durch Doppelfärbung für CD3/CD19 erfordern;
- (2) die Aussagekraft der Daten durch eine bei jeder Analyse mitgeführten Standardkontrolle (Blut derselben gesunden Person) deutlich verbessert wird, da die Comet Assay Analysen relativ starken Schwankungen unterliegen. Insbesondere finden sich bei 15 min Reparaturzeit grosse Schwankungen zwischen Experimenten, die vermutlich auf technische Probleme zurückgeführt werden können.
- (3) aus den Rohdaten der Leukämiepatienten die Tendenz ersichtlich ist, dass die Fähigkeit zur Reparatur strahleninduzierter DNA Brüche (SSB und DSB) verringert ist, und zwar bei einigen Proben sehr deutlich.

2.4. Statistische Auswertung

2.4.1. Apoptose

Für die statistische Auswertung wurden die 3 Patientenkollektive, und zwar die Leukämie-Patienten der Kliniken in München und Regensburg sowie das Kollektiv der jungen Lungentumor-Patienten (LUCY) und das Kollektiv der Normalpersonen aus der KORA S2000 Studie getrennt betrachtet. Die bei der Darstellung der Experimentaldaten verwendeten „induzierten Apoptosewerte“ (Abb. 22), die durch Subtraktion der spontanen Apoptosewerte (A_0) von den Apoptosewerten nach Bestrahlung mit 0,4 bzw. 0,8 Gy berechnet wurden, zeigen eine deutliche inverse Abhängigkeit von den Spontanwerten (Spearman-Rangkorrelationstest, $p = 0,023$ bei 0,4 Gy und $p = 0,041$ bei 0,8 Gy bei den Standardkontrollwerten, $p = 0,011$ bei 0,4 Gy und $p = 0,026$ bei 0,8 Gy bei den zusammengefassten Patientengruppen). Die spontanen Apoptose-Werte variieren bei den verschiedenen Tumor-Patienten sehr stark, was auf experimentelle Verfahren zurückzuführen sein kann

(Einfrieren/Auftauen der Zellen), oder auf eine vorhergehende Behandlung durch Chemotherapeutika zurückgehen mag. Aus diesem Grunde wurden für die weiteren Analysen „Apoptose-Koeffizienten“ benutzt, in denen die induzierten Apoptosewerte ähnlich wie bei der Berechnung des Reparatur-Koeffizienten im Comet Assay auf die nicht apoptotischen Zellen der Kontrolle, $1 - A(0)$, bezogen werden. Bezeichnen A_i die induzierten Apoptosewerte,

$$A_i = A(D) - A(0),$$

dann ergibt sich für die Apoptose-Koeffizienten (AK) bei $D = 0,4$ oder $0,8$ Gy (40 oder 80 cGy):

$$AK = \left[\frac{A_i}{1 - A(0)} \right] \times 100\% = \left[1 - \frac{1 - A(D)}{1 - A(0)} \right] \times 100\%$$

Damit wird die Abhängigkeit von den stark variablen spontanen Apoptosewerten $A(0)$ eindeutig vermindert (Spearman-Rangkorrelationstest, $p = 0,14$ bei $0,4$ Gy und $p = 0,32$ bei $0,8$ Gy bei den Standardkontrollwerten, $p = 0,14$ bei $0,4$ Gy und $p = 0,44$ bei $0,8$ Gy bei den zusammengefassten Patientengruppen).

In Abb. 24 sind die Apoptose-Koeffizienten für die Patientengruppen der Leukämie-Patienten des Klinikums Großhadern (Patienten München) und des Klinikums Regensburg (Patienten Regensburg), für die LUCY Patienten und für die KORA-Gruppe gezeigt. Als errechnete Differenzwerte können die induzierten Apoptosewerte und die Apoptosekoeffizienten auch negativ sein. Der theoretische oder 'Erwartungswert' ist natürlich positiv. Aus statistischer Sicht sind wegen der relativ breiten Streuung negative Werte eher 'signifikant niedrig' als positive Werte. Unter Verwendung der Streuung ($\sigma = 8,46$) der Werte der Standardkontrolle wurde für jede Gruppe ein 95%-Konfidenzbereich so ermittelt, dass die Bereichsmitte dem Mittelwert der Werte im Bereich entspricht. Jedes Symbol kennzeichnet den Apoptose-Koeffizienten für die Werte für eine Person. Alle Werte, die ausserhalb des 95%-Konfidenzbereichs liegen, indizieren „auffälliges Verhalten“ der Blutproben der jeweiligen

Es lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- (1) Bei jedem Tumor-Kollektiv gibt es einige Proben, die signifikant reduzierte „auffällige“ Apoptose-Koeffizienten haben. Dies gilt erstaunlicherweise auch für das KORA-Kollektiv.
- (2) Es gibt bei dem Kollektiv der Leukämie-Patienten aus Regensburg und bei den KORA-Kontrollen einige wenige Fälle, die einen signifikant höheren Apoptose-Koeffizienten zeigen.
- (3) Im Vergleich zu dem Kollektiv der KORA-Kontrollpersonen zeigt sich bei allen drei Tumor-Kollektiven auch ohne die herausragenden Fälle die Tendenz zu einer *reduzierten* Apoptose-Kapazität (Wilcoxon-Rangtest, signifikant für die Gruppen München, $p = 0.0087$, und Regensburg, $p = 0.020$) – d.h. die Gruppenmittelwerte mit ihren Konfidenzintervallen liegen tiefer als die der KORA-Kontrollen..

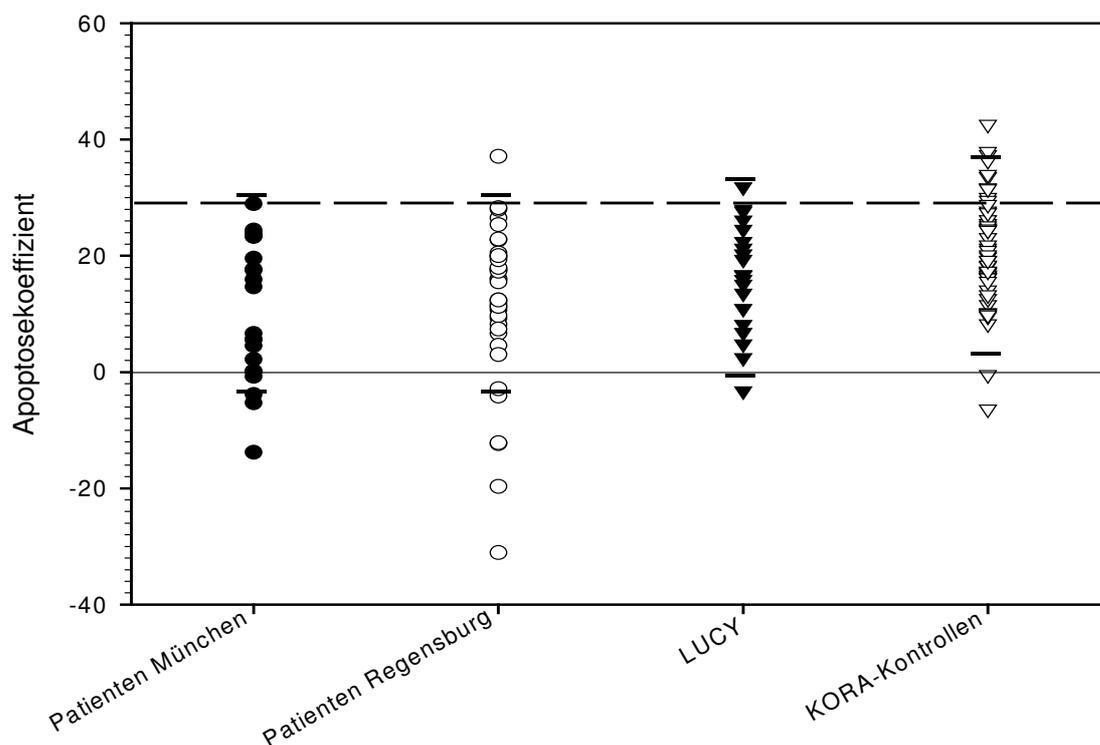


Abb. 24 Dargestellt sind die Apoptose-Koeffizienten nach *in vitro* Bestrahlung (0,8 Gy) der Blutproben der 4 verschiedenen Kollektive der Leukämie-Patienten München (Σ 21), der Leukämie-Patienten Regensburg (Σ 38), der LUCY-Patienten (Σ 20) sowie der KORA-Kontrollpersonen (Σ 51). Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert der Standardkontrolle an, die kurzen Striche die 95 % Konfidenz um den jeweiligen Gruppenmittelwert, der auf der Basis der Streuung der Standardkontrolle berechnet wurde.

Für die Interpretation der Daten bietet sich folgendes an:

Eine *erhöhter* Apoptose-Koeffizient reflektiert erhöhte *strahleninduzierte* Apoptose. Dies wiederum entspricht einem erhöhten Anteil an Zellen, die infolge von Bestrahlung sterben und somit eine erhöhte Strahlensensitivität der Lymphozyten der betreffenden Personen begründen können. Bei der Antragstellung war dieser Phänotyp als erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit definiert worden, wie er exemplarisch anhand der genetisch definierten, strahlenempfindlichen immortalisierten Zellen von AT-Patienten definiert ist. Spätere Publikationen zeigten jedoch, dass dieser Phänotyp von der Immortalisierung der Zellen abhängen kann, dass nämlich umgekehrt primäre Zellen von AT-Patienten eine reduzierte Apoptose nach Bestrahlung zeigen. Eigene Untersuchungen an NBS-Zellen untermauern die Möglichkeit, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von AT- und NBS-Zellen mit einer defekten Regulation der Apoptose korreliert, insofern als weniger strahlen-induzierte Apoptose in diesen Zellen auftritt.

Erstaunlich bei den Untersuchungen war zunächst der vergleichsweise höhere Anteil von Personen, deren Blutzellen einen *verringerten* Apoptose-Koeffizienten zeigen, was die Interpretation einer reduzierten Apoptose nach Bestrahlung nahelegt. Entsprechend der obigen Ausführungen könnte eine sich anbietende Interpretation sein, dass in diesen Zellen durch die reduzierte Kapazität zur Apoptose sich der Anteil potentiell tumorigener Zellen erhöhen kann. Diese Hypothese wird untermauert durch eine kürzlich veröffentlichten Studie an menschlichen B-CCL Zellen (chronisch lymphotische B-Zell-Leukämie), in der ebenfalls eine Subpopulation mit signifikant reduzierter Apoptose gefunden wurde (Blaise R. et al. 2002).

2.4.2. Comet Assay

Die Standardabweichungen des Reparaturkoeffizienten (RK) und von Gruppenmittelwerten von RK sind mit Hilfe von Binomialverteilungsmodellen und der Maximum-Likelihood-Methode berechnet worden (McCullagh, P. and Nelder, J.A., 1989). Dabei wurden für jeden Versuch die Anzahl ausgewerteter Zellen (bei 0 Gy: 200 bei der Standardkontrolle und 350 pro Patient; bei 4 Gy: 100 pro Spender) und die Anzahl ungeschädigter Zellen berücksichtigt. Für die Unterscheidung von signifikant abweichenden Befunden wurde der Likelihood-Quotiententest verwendet.

Die in Abb. 23 dargestellten Reparatur-Koeffizienten konnten auch für die statistische Analyse verwendet werden, und in Abb. 25 sind exemplarisch die

Reparaturkoeffizienten (RK) für eine Reparaturzeit nach 60 min für die Kollektive der Leukämiepatienten der Kliniken in München und Regensburg dargestellt, sowie für die KORA-Kontrollpersonen. Auf grund der sehr hohen Zahl an spontanen Brüchen bei den Proben der LUCY Patienten wurden die Analysen des LUCY Kollektivs mittels Comet Assay zurückgestellt. Es sind zusätzlich die Einzelwerte der Standardkontrolle aufgetragen, woraus die grosse (asymmetrische) Variabilität der Daten des Comet Assay ersichtlich ist.

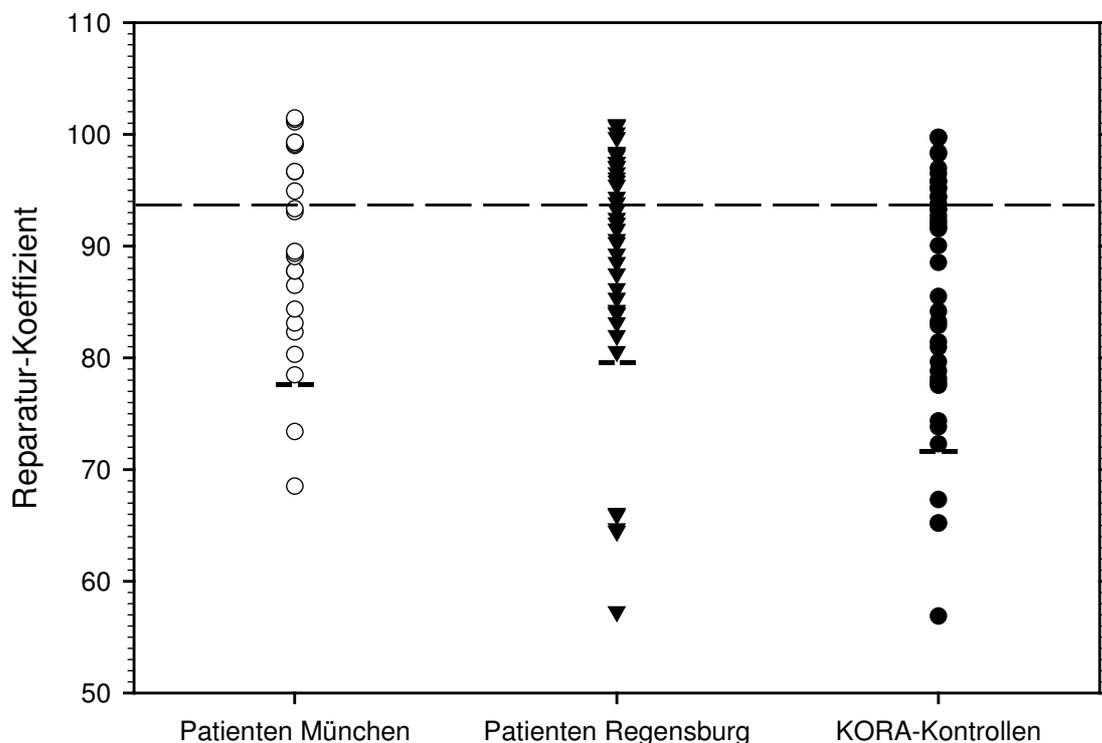


Abb. 25 Die Reparatur-Koeffizienten für 60 min Reparaturzeit im Comet-Assay sind für jede Blutprobe (Doppelbestimmung) aufgetragen, und zwar für die Leukämie-Patienten-Kollektive München ($\Sigma 20$) und Regensburg ($\Sigma 38$) und die KORA-Kontrollen ($\Sigma 41$). Kurze Striche markieren ein unteres Signifikanzniveau im Likelihood-Quotiententest.

Es ist aus den Daten ersichtlich, dass in einzelnen Fällen, die allerdings erstaunlicherweise nicht sehr zahlreich sind, eine ca. 30 bis 40%ige Reduktion der Reparaturkapazität zu finden ist. Wegen der Standardkontrolle, die bei jedem Experiment mitläuft, ist für die einzelnen „auffälligen“ Proben zu belegen, dass sie wirklich eine reduzierte Reparaturkapazität zeigen und nicht experimentell bedingt nur vermeintlich mit reduzierter Kapazität reparieren. Bei den hier nicht gezeigten Daten für

120 min Reparaturzeit sind in einigen Fällen die Proben derselben Patienten auffällig, es gibt jedoch auch eine Anzahl von Proben, die nur bei 60 min oder bei 120 min Reparaturzeit auffällig sind, was vermutlich durch die Variabilität des Comet Assays zu erklären ist. Grundsätzlich aber entsprechen diese Daten den Erwartungen, dass erhöhte Strahlensensibilität mit reduzierter Reparatur-Kapazität für DNA-Brüche übereinght. Eine allgemeine Korrelation zwischen den Befunden für Reparatur- und Apoptose-Kapazität konnte nicht nachgewiesen werden (Spearman Rangkorrelationsstest $p > 0.05$ für Patientengruppen München, Regensburg und für die Kontrollgruppe KORA). Es fanden sich jedoch 2 Patienten, bei denen deutlich reduzierte Apoptose-Koeffizienten mit niedrigen Reparatur-Koeffizienten gepaart auftreten.

Bemerkenswert sind die Ergebnisse für die KORA-Kontrollpersonen, die klinisch als unauffällig angesehen werden und von denen „normale Strahlensensibilität“ erwartet wurde. Es gibt zwei Erklärungsmöglichkeiten für die in Abb. 25 gezeigten Befunde:

(1) Die Person, die die Blutzellen für die Standardkontrolle lieferte, gehört eher zu einer Gruppe in der Normalbevölkerung, die resistenter als das Gruppenmittel ist. Somit würden Proben des KORA-Kollektivs im unteren Bereich der Verteilung der Standardkontrolle auftreten und damit als „auffällig“ bewertet werden.

(2) Die durch reduzierte Reparatur-Kapazität bzw. geringe Apoptose-Koeffizienten der Blutproben auffallenden Personen des KORA-Kollektivs sind wirklich etwas strahlensensibler als das Gruppenmittel. Dies wäre ein bemerkenswerter Befund, da somit in einem Kollektiv von Normalpersonen ohne klinische Auffälligkeiten mit den von uns ausgewählten funktionellen Testverfahren für DNA Reparatur und Apoptose einige Blutproben identifiziert worden wären, die im Vergleich zum gesamten Kollektiv auffällig sind. In der Normalbevölkerung wird aufgrund der nach Hardy-Weinberg berechneten Allelfrequenzen von ATM-, NBS1- und anderen Mutationen ein Anteil heterozygoter Träger dieser Mutationen von 5-10% geschätzt. Für diese heterozygoten Träger kann aufgrund von Haploinsuffizienz, dominant-negativen Mutationen und anderen Mechanismen eine erhöhte Strahlensensibilität und eine verstärkte Disposition für Krebs erwartet werden. Am Beispiel heterozygoter AT-Mutationen wurde bereits mehrfach eine solche erhöhte Krebsinzidenz berechnet und postuliert.

Zusammenfassend lässt sich bei einer statistischen Analyse schlussfolgern:

(1) Bei allen Personen-Kollektiven, und zwar Tumorpatienten und Kontroll-Personen fallen einige auf, deren Blutproben reduzierte oder erhöhte Apoptose, sowie reduzierte Reparaturkapazität zeigen. Es erscheint sehr wichtig, die Blutproben dieser Personen gründlichen weiteren Untersuchungen zu unterziehen.

(2) Durch die experimentellen Schwankungen, die bei funktionellen, zellbiologischen Assays wie Apoptose und DNA-Reparatur bekannterweise relativ gross sind, bleiben erhebliche Unsicherheiten bei der Interpretation der Daten. Das erklärt, dass nur in wenigen Fällen dieselben Personen auffällig werden für beide Analysen der DNA-Reparatur über 60 bzw. 120 min nach einer Dosis von 4 Gy. Bei der Analyse der Apoptose findet sich eine gute Korrelation zwischen den Koeffizienten für 0,4 Gy und 0,8 Gy (Spearman Rangkorrelationstest, $p < 0.001$), aber zwischen einzelnen Individuen gibt es große Unterschiede bei den spontanen Apoptosewerten. Daher erscheint es sinnvoll, die zellulären/ funktionellen Analysen durch molekularbiologische Tests zu ergänzen, die an der limitierten Anzahl funktionell auffälliger Patientenproben durchgeführt werden können. Es empfiehlt sich, nach Kandidaten-Genen (z.Bsp. SNP's) und/oder -Proteinen zu schauen, die – zusammen mit den hier beschriebenen zellulären/funktionellen Tests - als Indikator für Strahlensensibilität dienen können.

2.5. Korrelation der Ergebnisse der *in vitro* Bestrahlung von Blutproben mit klinischen *in vivo* Befunden

2.5.1. Heterogenität der Leukämie-Kollektive

Ein grosses Problem der vorliegenden Studie sind die relativ kleinen Probandenzahlen – Ganzkörperbestrahlung von Leukämiepatienten ist kein alltägliches Geschehen. Dieses Problem verschärft sich, wenn man berücksichtigt, dass sich die Kollektive der Leukämie-Patienten aus 12 unterschiedlichen Leukämie- und Lymphom-Typen zusammensetzen. Es war daher von Interesse festzustellen, ob sich ein oder ggf. mehrere Subtypen durch Auffälligkeiten bezüglich ihres Apoptose- und/oder Reparatur-Verhalten auszeichnen (Abb. 26, 27).

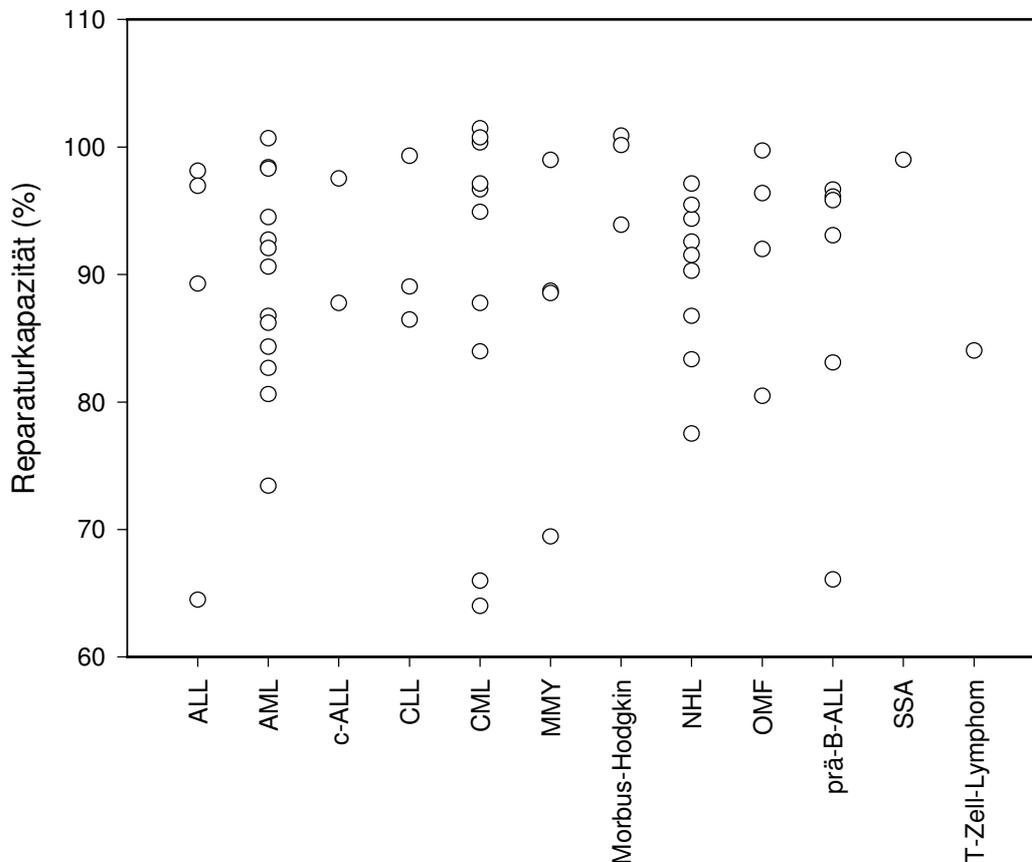


Abb. 26 Zuordnung der Reparatur-Koeffizienten der Patienten aus München und Regensburg bei 60 min Reparaturzeit nach einzelnen Typen von Leukämie und Lymphomen

Die Abbildungen zeigen, dass die Gesamtheit von 59 erfolgreich analysierten Proben von Leukämie-Patienten zu den Typen ALL (akute lymphatische Leukämie, 4 Probanden), zu AML (akute myeloische Leukämie, 11 Probanden), zu CML (chronische lymphatische Leukämie, 10 Probanden), zu NHL (Non-Hodgkin-Lymphom, 9 Probanden) und zu Prä-B-ALL (5 Probanden) zuzuordnen sind – dies sind 39 von insgesamt 59 Fällen (66 %). Allen anderen Typen (CLL, MMY, Morbus Hodgkin, OMF, SSA, T-Zell-Lymphom und c-ALL) sind jeweils nur 1 bis 3 Probanden zuzuordnen. Auffällig bezüglich deutlich reduzierter Apoptose-Kapazität werden Patienten mit ALL, AML, NHL und Prä-B-ALL; besonders auffällig mit einem stark erhöhten Apoptose-Koeffizient ist ein CML-Patient, wobei bemerkenswert ist, dass bei diesem Subtyp keine Fälle mit reduzierter Apoptose-Kapazität auftreten, während dies besonders deutlich für ALL und AML wird. Der Unterschied der Apoptosekoeffizienten

bei 0,8 Gy zwischen den beiden Gruppen CML und AML war signifikant (Wilcoxon Rangtest, $p = 0.029$). Bezüglich reduzierter Reparatur-Kapazität werden Patienten vom Subtyp ALL, CML, MMY und Prä-B-ALL auffällig.

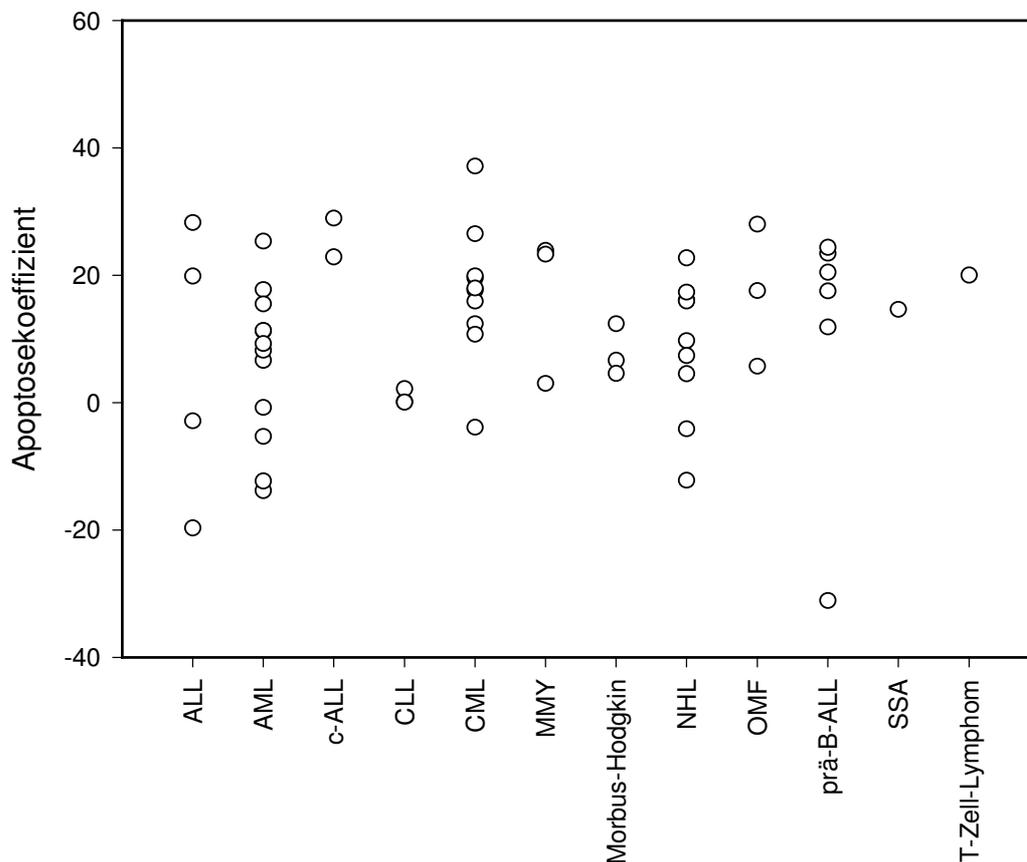


Abb. 27 Zuordnung der Apoptose-Koeffizienten (0,8 Gy) der Patienten aus München und Regensburg nach einzelnen Typen von Leukämie und Lymphomen

Allerdings sind die Patientenzahlen, wenn sie nach Leukämie/Lymphom-Typen aufgeschlüsselt werden, so klein, dass dies nur sehr vorläufige Aussagen sein können. Das Ergebnis, dass Zellen von CLL Patienten nicht auffällig sind, entspricht Befunden mit grösseren Patientenkollektiven, die von Myllyperkio et al. 1999 beschrieben wurden.

2.5.2. Korrelation von *in vitro*- Daten für potentielle Sensitivität mit *in vivo*- Daten für klinische Sensitivität

Wenn die Gesamtheit der Apoptose- bzw. Reparatur-Koeffizienten korreliert werden mit einzelnen klinischen Merkmalen - wie z. B. Mucositis verschiedener Grade, Fieber und Durchfall, aufgeschlüsselt nach ja/nein – so findet sich keinerlei Korrelation für Probanden, deren Blutzellen bei den *in vitro* Assays auffällig wurden, allerdings sind auch hier die relativ kleinen Probandenzahlen problematisch. Wenn man hingegen einzelne Fälle analysiert, die durch ihre Reparatur-bzw. Apoptose-Koeffizienten auffällig wurden, so sind vorläufig zwei Probanden gefunden worden, bei denen sowohl erhöhte Apoptose-Kapazität als auch reduzierte Reparatur-Kapazität gefunden wurden und bei denen ebenfalls relativ schwere klinische Reaktionen auftreten. Allerdings fanden sich auch Patienten mit ähnlich schweren klinischen Reaktionen, deren Blutproben bei den *in vitro* Assays nicht auffällig wurden. Das bedeutet, dass das Projekt erfolgreich ist hinsichtlich der Auswahl der eingesetzten Methoden, um unter bestrahlten Blutproben von Leukämiepatienten solche zu identifizieren, die bezüglich ihres Apoptose- und Reparatur-Verhaltens auffallen. Die Korrelation zu den klinischen Parametern ist jedoch nur ansatzweise gegeben.

2.6. Diskussion und Bewertung der etablierten Methoden und der Befunde

2.6.1. Voraussetzungen

Es war Aufgabe des Projektes, die Strahlenwirkung *in vitro* von primären Lymphozyten verschiedener Tumor-Patienten-Kollektive sowie eines Kollektivs von „Normal-Personen“ (KORA S2000 Studie) zu analysieren und dabei Proben zu identifizieren, deren Verhalten sich von dem der jeweiligen Gruppe signifikant unterscheidet. Durch Korrelation der *in vitro* Daten mit klinischen Befunden an den Patienten (*in vivo*) bezüglich ihrer potentiellen akuten Überempfindlichkeit gegen Strahlung und Spätreaktionen in einem Zeitraum von 5 Jahren sollte ermittelt werden, ob sich *in vitro* Tests für die Strahlenwirkung auf Zellen zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit der betreffenden Personen eignen.

In Vorversuchen waren als sensitive und langfristig für Routine-Analysen geeignete Methoden ausgewählt worden, und zwar FACS-basierte Assays für Apoptose (AnnexinV und Apo2.7 gleichwertig) sowie der Comet Assay zur Quantifizierung der Induktion und Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Für die

Standardisierung der Apoptose- und Reparatur-Analysen war die in jedem Versuch mitgeführte Standard-Kontrolle (Zellen jeweils derselben gesunden Person) unerlässlich. Bei den Analysen zur Apoptose wurde die Qualität der Messungen wesentlich verbessert durch die Differenzierung der B- und T-Lymphozyten (durch CD3/CD19 Fluoreszenz-Markierung m.H. von Antikörpern), insbesondere bei Proben, die unter suboptimalen Bedingungen transportiert und verarbeitet wurden. Es standen 70 Proben von Leukämiepatienten (30 aus dem Klinikum Großhadern, 40 aus Klinikum Regensburg), 24 Proben von jungen Lungentumor-Patienten und 60 Proben der KORA S2000 Personen (beide durch GSF-Epidemiologie und BfS) zur Verfügung, von denen je nach Assay 70-95% erfolgreich analysiert wurden.

Bei den Leukämiepatienten standen Blutproben zur Verfügung, die sowohl vor und nach der Ganzkörpertherapie abgenommen waren. Da der Zustand der Zellen nach Ganzkörperbestrahlung sehr schlecht war, wurden entgegen der ursprünglichen Planung nur die Proben analysiert, die vor der Bestrahlung gezogen worden waren. Viele der Proben der Lungentumorpatienten waren ebenfalls in relativ schlechten Zustand. Durch die CD3/CD19 Markierung (siehe 2.1.) konnte die strahleninduzierte Apoptose dennoch gut gemessen werden. Jedoch war der Anteil der Zellen mit stark degradierter DNA relativ hoch, so dass die Reparatur-Analysen zunächst nicht durchgeführt wurden.

2.6.2. Präparation der Lymphozyten

Für die gute Qualität der Lymphozytenproben sind ein möglichst schneller Transport der in den Kliniken abgenommenen Blutproben sowie eine schnelle Präparation und standardisiertes Einfrieren der Lymphozyten eine wichtige Voraussetzung dafür, dass einheitliche B- und T-Zellpopulationen mit möglichst geringer spontaner Apoptoserate und DNA Fragmentierung analysiert werden können. Von allen Proben ist noch Zellmaterial eingefroren vorhanden, das bei Bedarf zur Herstellung lymphoblastoider Linien (zusammen mit Dr. Illig, Dr. Kranz des GSF-Instituts für Epidemiologie) genommen werden kann.

2.6.3. Bewertung der Apoptose *in vitro* bestrahlter Lymphozyten

Bereits aus den experimentellen Rohdaten, insbesondere der Leukämiepatienten, war ersichtlich, dass der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen nach Bestrahlung mit 0,4 und 08 Gy, 48 h nach Bestrahlung (reduziert um den Spontan-

wert) bei Analyse mit dem AnnexinV/PI Test bei einer grossen Anzahl an Patienten geringer war als bei der mitgeführten Standardkontrolle (siehe Abb. 6 als Beispiel. Für eine statistische Auswertung der Daten wurde der Apoptose-Koeffizient (AK) definiert (siehe 2.3.), der von dem spontanen Apoptosewert unabhängig ist. Durch Auftragung der AK für 0.4 und 0.8 Gy für jedes Kollektiv getrennt (siehe Abb. 12) bestätigt sich der Eindruck, dass die Mehrheit der Proben von Tumor-Patienten *reduzierte* Apoptose-Koeffizienten nach Bestrahlung zeigen und nur 1 Fall mit einem *erhöhter* AK zu finden ist. Bemerkenswert ist der Befund, dass sich auch bei der Kollektion von Testpersonen der KORA S2000 Studie Probanden finden, deren AK erhöht (1 Fall) oder erniedrigt (2 Fälle) ist. Erhöhte Strahlenempfindlichkeit könnte auf verstärkter Apoptose (erhöhtem AK) beruhen; reduzierte Apoptose (erniedrigte AK) wiederum lässt die Wahrscheinlichkeit steigen, dass stark geschädigte, potentiell tumorigene Zellen nicht eliminiert werden.

2.6.4 Bewertung der DNA-Strangbruch-Reparatur *in vitro* bestrahlter Lymphozyten

Nach Bestrahlung mit 4 Gy und Inkubationszeiten von 0, 15, 60 und 120 min wurden die Reparaturkoeffizienten (RK) als prozentualer Anteil der ungeschädigten Zellen nach Bestrahlung von dem Anteil der ungeschädigten Zellen in der unbestrahlten Kontrolle berechnet und über den jeweiligen Zeitpunkten aufgetragen. Auch hier fanden sich Proben, die ein eindeutig schlechteres Reparaturverhalten zeigen als die Gruppe (siehe Abb. 10, 13), und zwar sowohl bei den Kollektiven der Leukämie-Patienten als auch bei den KORA Kontrollen. Es gibt folglich einige Fälle, bei denen erhöhte Strahlensensibilität mit reduzierter Kapazität zur Reparatur von DSB (den funktionell bedeutesten Schäden ionisierender Strahlung) begründet sein könnte. Jedoch weisen die Ergebnisse der PFGE Analyse mit NBS^{-/-} Zellen, die strahlensensibel aber nicht reparaturdefekt sind, darauf hin, dass diese Kopplung nicht zwingend ist (siehe II.2.2.1).

2.6.5. Korrelation der *in vitro* Daten mit *in vivo* Befunden

66 % der Gesamtheit von 59 erfolgreich analysierten Proben von Leukämie-Patienten ist nur 5 Subtypen zuzuordnen, nämlich ALL (akute lymphatische Leukämie), Prä-B-ALL, AML (akute myeloische Leukämie), CML (chronische lymphatische Leukämie) und zu NHL (Non-Hodgkin-Lymphom). Alle anderen Typen (CLL, MMY,

Morbus Hodgkin, OMF, SSA, T-Zell-Lymphom und c-ALL) sind jeweils nur durch 1 bis 3 Probanden vertreten. Auffällig bezüglich deutlich reduzierter Apoptose-Kapazität werden Patienten mit ALL, AML, NHL und Prä-B-ALL; besonders auffällig mit einem stark erhöhten Apoptose-Koeffizient ist ein CML-Patient, wobei bemerkenswert ist, dass bei diesem Subtyp keine Fälle mit reduzierter Apoptose-Kapazität auftreten, während dies besonders deutlich für ALL und AML wird. Bezüglich reduzierter Reparatur-Kapazität werden Patienten vom Subtyp ALL, CML, MMY und Prä-B-ALL auffällig. Dies können jedoch nur sehr vorläufige Aussagen sein, da die Patientenzahlen, wenn sie nach Leukämie-/Lymphom-Typen aufgeschlüsselt werden, sehr klein sind. Dennoch ergibt sich der interessante Aspekt, dass Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungsformen bei Analyse der Strahlenwirkung auf Zellmaterialien für unterschiedliche zelluläre und vermutlich auch molekulare Marker auffällig werden.

Diese Befunde, die auch bei anderen Autoren beschrieben sind (Blaise et al. 2002) liefern ein starkes Argument dafür, dass nicht ein einziger Test, sondern mehrere Tests für unterschiedliche Zellfunktionen und molekulare Marker entwickelt werden sollen. Für die verstärkte Suche nach Biomarkern (auf DNA- und Proteinebene) spricht, dass funktionelle Tests wie die in dem Projekt durchgeführten relativ aufwändig sind und ziemlichen Schwankungen unterliegen, was deren Sensitivität mindert (siehe auch Baumann et al. 2003, Fernet und Hall 2004, Norppa 2004). Andererseits sind sie – wie hier beschrieben – in der Lage, eine Vor-Selektion möglicher Kandidaten für erhöhte Strahlenempfindlichkeit durchzuführen. Diese Kandidaten stehen dann zur Verfügung, um bisher nicht klar definierte einheitliche molekulare Parameter der Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen, bzw. eine Menge von exemplarisch bekannten Genen/Proteinen zu analysieren, deren genetischer Defekt mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit korreliert.

Unser Befund, dass es in den untersuchten Tumor-Patienten-Kollektiven nur wenige Patienten gibt, bei denen beides, zelluläre Auffälligkeiten nach Bestrahlung und schwere klinische Reaktionen, zu finden sind, spricht ebenfalls dafür, dass nach weiteren funktionellen Tests und Biomarkern gesucht werden muss. Tatsächlich sind Strahlenreaktionen von Organismen sehr komplex und durch sehr viele Faktoren bestimmt, so dass es verwunderlich wäre, wenn es einfache Korrelationen zu einem oder wenigen *in vitro* Tests mit Zellen gäbe.

3. Voraussichtlicher Nutzen (Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des vorgeschriebenen Verwertungsplans)

3.1. Wirtschaftliche Nutzung

Zum jetzigen Zeitpunkt ist keine wirtschaftliche Nutzung der erhobenen Daten möglich. Bisher sind wissenschaftliche Analysen über das Auffinden individueller Strahlenempfindlichkeit gemacht worden, die mittelfristig klinische Relevanz haben könnten und im Erfolgsfall langfristig wirtschaftlichen Nutzen durch wirkungsvollere, individualisierte Therapiekonzepte haben sollten. Sollten sich die Ergebnisse für die KORA-Population erhärten, liessen sich langfristig Tests entwickeln, die zur Risikoabschätzung der individuellen Strahlensensibilität der „unauffälligen“ Normalbevölkerung beitragen könnten.

3.2. Potentielle Anwendergruppen am Standort Deutschland

Die Ergebnisse sind langfristig evtl. nutzbar durch Tumorkliniken, die Strahlen- und Chemotherapie durchführen. Im speziellen Falle dieses Projekts könnten die Befunde interessant werden für eine gezieltere Therapie von Leukämiepatienten, bei denen Ganzkörperbestrahlung und Knochenmarktransplantationen durchgeführt werden.

3.3. Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen

Die Zusammenarbeit mit den Kliniken, Med. Klinik III des LMU-Klinikums Großhaderns und des Universitätsklinikums Regensburg haben sich bewährt und sollen fortgesetzt werden. Die Zusammenarbeit mit der Firma Rubikon kann nicht fortgesetzt werden, da die Firma nicht mehr existiert.

3.4. Wissenschaftliche Meilensteine

Die Frage nach dem Vorhandensein unterschiedlicher individueller Strahlenempfindlichkeit, die sich in unterschiedlichem (vorwiegend reduziertem) Reparatur- und Apoptose-Verhalten von Blutzellproben einzelner Patienten und Kontrollpersonen äussert, kann positiv beantwortet werden. Trotz grosser experimenteller Variabilität, denen durch ein geeignetes Design (z.B. identische Standardkontrolle bei jedem Experiment) begegnet wurde, können signifikant auffällige Proben identifiziert werden.

Der jetzige Stand der Kenntnis ist jedoch noch nicht ausreichend, um potentiell überempfindliche Individuen verlässlich zu diagnostizieren. Es müssen grössere Pro-

banden-Kollektive analysiert werden, und es empfiehlt sich, die ihrer Natur nach variablen, aber als ‚Vor-Screening‘ geeigneten funktionellen Assays durch Analyse von Kandidatengen und –proteinen zu ergänzen. Langfristig sind DNA und Protein-Analysen vermutlich wesentlich aussagekräftiger, schneller und preiswerter als funktionelle Analysen, sofern sich Testsysteme mit relevanten Genen/Proteinen identifizieren lassen. Die im Rahmen dieses Projektes identifizierten auffälligen Zellen werden für diese nächste Stufe der Identifizierung von Kandidatengen und –proteinen sehr hilfreich sein. Es können in Zukunft Materialien von Personen, deren Blutproben auffällig wurden, mit molekularen Techniken mit denen, die funktionell unauffällig waren, verglichen werden. Damit ergibt sich die Hoffnung, immerhin in einer Subgruppe von Patienten, Marker für individuelle Sensitivität zu finden. Wie dargestellt, könnten dies z.B. Patienten mit ALL, AML, NHL sein.

4. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Frage der individualisierten Tumorthherapie ist höchst aktuell, und in diesem Zusammenhang sind viele Wissenschaftler in Kooperationen mit Kliniken darum bemüht, Materialien von Patienten (Blut oder Tumorgewebe) mit verschiedenen zellbiologischen, zytogenetischen und molekularen Techniken zu analysieren und die *in vitro* Ergebnisse mit den klinischen Aufzeichnungen über akute und späte Strahlen(über)reaktionen zu korrelieren. Aufgrund der Komplexität des Phänomens wird es nicht möglich sein, nur einen einzigen Marker für „Strahlenempfindlichkeit“ zu finden, sondern es wird notwendig sein, eine Testbatterie mit unterschiedlichen funktionellen Tests und Markertests zu entwickeln. Diese Arbeiten sind so komplex, dass viele Labors und Kliniken zusammenarbeiten müssen.

5. Veröffentlichungen der Ergebnisse

1. Poster und Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen:

(1) **Influence of p53 status on different apoptotic pathways induced by ionizing irradiation and UV treatment of human leukemia (HL-60) cells.**

L. Wolz^a, M. Nüsse^b, E. Fritz^a, J. Lu-Hesselmann^c (^a GSF-Institute for Molecular Radiobiology, ^b GSF-Flow Cytometry Group, 85758 Neuherberg, ^c Bundeswehr-Akademie, Institut für Strahlenbiologie, 80937 München). *Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology & Oncology, Ermatingen, Schweiz, 8.-10.6.2002*

(2) **Multiparametric analysis of radiosensitivity in leukemia patients and derived blood cells.**

L. Wolz^a, M. Nüsse^b, W. Beisker^b, H.J. Kolb^c, E. Holler^d, E. Fritz^{a,e}, F. Eckardt-Schupp^a (^a GSF-Institute of Molecular Radiobiology, ^b Flow Cytometry Group, ^c KKG Hematopoietic Cell-Transplantation 85764 Neuherberg, Germany, ^d University Clinic Regensburg, Germany, ^e Institute of Molecular Biotechnology, 07745 Jena). *Germany International Workshop on Radiation Health Effects at Low Doses or Low Dose Rates GSF, Neuherberg, Germany, 16.-18.2.2004*

(3) **Multiparametrische Erfassung der Strahlensensibilität von Blutzellen von Leukämie-Patienten zur Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit.**

L. Bauerschaper^a, S. Wilde^a, H. Braselmann^a, M. Nüsse^b, W. Beisker^b, M. Fiegl^c, H.J. Kolb^c, E. Holler^d, E. Fritz^{a,e}, F. Eckardt-Schupp^a (^aGSF-Institut für Molekulare Strahlenbiologie, ^bGSF-Gruppe Durchfluss-Zytometrie, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, ^cGSF-Klinische Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransformation, Marchionistr. 15, 81377 München; ^dKlinikum der Universität Regensburg, 93042 Regensburg; ^e Institut für Biotechnologie, 07745 Jena). *Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS, Darmstadt, 31.3. bis 2.4.2004*

(4) **Flow cytometric determination of individual blood cell radiation sensitivity in leukemia patients.**

W. Beisker^a, M. Nüsse^a, L. Bauerschaper^b, K. Ebel^c, H. Kolb^c, E. Fritz^b. (^aGSF-Gruppe Durchfluss-Zytometrie, ^bGSF-Institut für Molekulare Strahlenbiologie, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, ^cGSF-Klinische Kooperationsgruppe Hämatopoetische Zelltransformation, Marchionistr. 15, 81377 München). *ISAC International Society for Analytical Cytology, XXII International Congress, Montpellier, France, 2004*

2. Publikationen in internationalen Journalen:

Die Arbeiten an den etablierten Zelllinien konnten bereits zu 2 internationalen Publikationen im Berichtszeitraum beitragen:

Cao, J.P., Meyn, M.S., **Eckardt-Schupp, F.**, **Fritz, E.** (2001):

TEL1 from *S. cerevisiae* suppresses ionizing radiation-induced chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia cells without affecting cell cycle checkpoints. *Rad.Env.Biophys.* 40:309-315.

Raderschall, E., Bazarov, A., **Cao, J.**, Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H.H., Sedivy, J.M., Golub, E.I., **Fritz, E.**, Haaf, T. (2002):

Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J.Cell Science* 115:153-164

3. Weitere geplante Publikationen in internationalen Journalen:

Die Arbeiten an den primären Patientenzellen können erst nach vollständiger statistischer Analyse publiziert werden, geplant sind hier:

(A) Methodische Publikationen:

1. Nachweis strahleninduzierter Apoptose in primären Blutzellen durch multivariate Durchflusszytometrie. Autoren: Bauerschaper, Beisker, Eckardt-Schupp, Fritz, Nüsse, Wilde,
2. Multiparametrische Analyse der zellulären Strahlenwirkung. Autoren: Bauerschaper, Beisker, Bickeböller, Eckardt-Schupp, Fritz, Holler, Illig, Kolb, Kranz, Nüsse, Wichmann

(B) Strahlenwirkung:

3. Detektion strahlensensitiver Blutzellen von Leukämiepatienten und klinische Korrelation mit dem Patientenstatus. Autoren: Bauerschaper, Eckardt-Schupp, Fritz, Gomolka, Holler, Hornhardt, Illig, Kolb, Kranz, Nüsse, Wilde, Wichmann,
4. Detektion strahlensensitiver Blutzellen von jungen Lungentumorpatienten und klinische Korrelation mit dem Patientenstatus

Anhang: Zelllinien und Methoden

I. Zelllinien:

Fibroblastische Linien

TGR & TGR-rad51:	Wildtyp- sowie Rad51-überexprimierende SV40-Nagerfibroblasten
PPI & PPL928:	Wildtyp- und Rad51-überexprimierende primäre Rattenzellen
AT, AT-TEL, AT deltaTEL	Wildtyp-, TEL1-komplementierte-, sowie nicht komplementierte (deltaTEL) Ataxia telangiectasia Zellen (AT5BIVA)
A549	SV40-Mauszellen (Rubikon AG)
GM637, GM639	Wildtyp-Fibroblasten aus gesunden Probanden (SV40)

Lymphoblastoide Linien

HA-Linien (EBV)	AT-Zelllinien (kodiert);
P111; P247 (EBV)	Nbs1+/- Familien-Kontrollen der NBS-Patientenzellen
P112; P306 (EBV)	Nbs1-/- Patientenzellen
1095 (EBV)	gesunde Kontrollzellen
HL60, HL60-p53	menschl. Leukämiezellen (mit p53-Überexpression)
Jurkatzellen	menschl. T-Zellen (was ist das??)

II. Methoden zur Analyse von Strahlenempfindlichkeit

1. Vitalfärbung (Trypanblau-Test)

2. Apoptose-Assays

Zellkultur (mindestens 250.000 Zellen) werden in FACS-Röhrchen überführt und 3 min bei 1100 Upm zentrifugiert, anschliessend wird der Überstand dekantiert. Zugabe von 100 µl Antikörper-Lösung (19 µl PBS, 3 µl CD3-AK, 3 µl CD19-AK), danach 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln halten, danach Zugabe von 1 ml PBS, 3 min bei 1100 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren

AnnexinV-Assay:

Zugabe von 100 µl Annexin-Lösung (2 µl Annexin, 2 µl Propidiumjodid (50 µg/ml), danach 15 min bei RT im Dunkeln, anschliessend Zugabe von 100 µl Annexin-Puffer und Aufbewahrung auf Eis bis zur Messung.

Apo 2.7 Assay:

Zugabe von 100 µl kaltem Digitonin in PBSF (1000 µl PBSF versetzen mit 4 µl Digitonin-Stock-Solution (=25 mg/ml PBSF), leicht schütteln, 20 min auf Eis) und 2 ml kaltem PBSF, zentrifugieren für 3 min bei 1100 rpm, Überstand dekantieren. Zugabe von 50 µl Apo 2.7 (100 µl Apo 2.7 in 400 µl PBSF), leicht schütteln, 20 min bei RT im Dunkeln, danach Zugabe von 0,3 ml PBSF. Bis zur Messung im Dunkeln aufbewahren.

Caspase3-Assay:

300 µl RPMI-Medium + FCS versetzen mit 5 µl 30 x Working-Solution (10 µl FAM-DEVG-FMK in 40 µl PBS), 1 h bei 37 °C im Brutschrank halten; 2 x Zugabe von 1 ml Caspase-Waschpuffer (PBS), zentrifugieren für 3 min bei 1100 rpm, Überstand dekantieren, zum Schluss Zugabe von 201 µl Caspase-Waschpuffer + Propidiumjodid (10 µl Propidiumjodid in 2 ml PBS), Aufbewahrung auf Eis bis zur Messung.

3. Bivariate Zellzyklus-Analyse (FACS): siehe Uhrhammer et al.

4. Chromosomenpräparationen

Kultur: Zu jeweils 9 ml RPMI-Medium (20 % FCS + PS) in kleinen Kulturfläschchen wird 1 ml Vollblut und bei Bedarf 0,26 ml PHA-M (Phythämagglutinin-M, Gibco # 10576-015, in 10 ml H₂O gelöst, zupipettiert. Der Ansatz wird kurz geschüttelt und für 72 h im 37 °C Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Nach ca. 20-24 h wird der Ansatz auf drei Schälchen verteilt und mit je 0, 1 und 4 Gy bestrahlt. 2 h vor Ende der Inkubationszeit werden zur Kultur 150 µl Colcemid (5 µg/ml) zugegeben.

Präparation: Die Kultur wird in spitze Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1000 Upm 8 min zentrifugiert (bis Überstand klar ist); Überstand wird abgesaugt. 2 mal waschen mit je 5 ml Hanks-Lösung und anschliessend Überführung in 5 ml hypotone Lösung (0,075 M KCl-Lösung). Nach einer Inkubation bei 37 °C für 12 min Zentrifugation bei 900 Upm für 8 min. Danach Zugabe des Fixativs (1 Teil Eisessig: 3 Teilen Methanol), schnell mischen, zentrifugieren bei 1000 Upm für 8 min und Überstand absaugen (2 mal). Nach der 3. Fixativ-Zugabe Probe bei Raumtemperatur für 20 min oder über Nacht bei 4 °C fixieren lassen. Danach bei 1000 Upm, 5 min zentrifugieren, Überstand absaugen und erneut 5 ml Fixativ zugeben, gut mischen und zentrifugieren bei 1000 Upm, 5 min. Wenn das Pellet sauber ist, Überstand nicht absaugen.

Auftragen der Zellen auf den Objektträger (OT): Überstand von den Zellen absaugen und Fixativ zugeben (500-1000 µl), so dass noch eine opalisierende Suspension erkennbar ist. OT mit H₂O_{dest} (RT) bestreichen, 30 µl Zellsuspension auftragen und 7 Tage bei RT trocknen lassen

Giemsa-Färbung: 5 ml 1x PBS + 500 µl Giemsa-Stammlösung für 5 OT (nur 1 x verwenden), OT 10 min in Giemsa-Lösung stellen, Färbelösung unter laufendem Wasser abwaschen und trocknen lassen.

Die Erfassung der Chromosomenaberrationen erfolgte konventionell durch mikroskopische Analyse in Doppelblind-Studien.

4. Mikrokerne

(strahleninduzierte Mikrokerne wurden durch Anwendung der BrdU-Hoechst-
quenching-Technik nach Müller et al. 1996, Nüsse & Marx 1997 im FACS analysiert)

5. Comet Assay

(Laborprotokoll für Lungen CA-Projekt; *nach Singh* modifiziert; teilweise aus dem Protokoll nach *Bauch*)

Vorbereitung der Objektträger: Erste Schicht: 0,1 % Agarose (SERVA, Art. Nr. 11408)

in NaCl (0,9 %) suspendieren (0,01g in 10 ml NaCl), Schütteln, 10 min im Wasserbad quellen lassen (50 °C), in der Mikrowelle (50 ml Falcon-Röhrchen) mit lose aufgeschraubten Deckel kurz aufkochen lassen, 3 x vortexen, in Eppendorf-Cups à

1 ml portionieren, bei 50°C im Thermomixer bis zur Verwendung flüssig halten (min 1 h). Objektträger (Fa. Erie Sci. über Fa. Menzel) mit aqua dest. (oder 70 % EtOH) abspülen, auf Heizplatte (46°C) trocknen, Objektträger mittels Spatel mit je 200 µl Agarose gleichmäßig bestreichen, Agarose trocknen lassen (mind. 1 Stunde, besser: ü.N.)

Bestrahlung: 50.000 Zellen /10 µl NaCl aliquotieren und auf Eis bestrahlen (4 Gy ⁶⁰Co-Gamma-Strahlen, Dosisrate 0.71 Gy/min)

10 µl bestrahlte Zellsuspension mit 100 µl Agarose (0,5 %ige Agarose (SeaPlaque GTG Agarose; 0,05 g auf 10 ml NaCl) mischen (entsprechend 10 µl unbestrahlte Kontrollsuspension), auf den präparierten Objektträger pipettieren und mit Deckglas (Triton-X-vorbehandelt) vorsichtig abdecken und 5 min auf Kälteplatte aushärten lassen.

Reparaturzeit: Die bestrahlten Zellen im Inkubator/Brutschrank bei 37°C für 0 min (sofort auf Eis), 15 min und 60 min inkubieren, danach mit 100 µl Agarose versetzen und wie oben auf OT auftragen.

Zellyse: Deckgläser entfernen, Objektträger in Lysispuffer I (2,5 M NaCl, 100 mM Na₄EDTA pH 10, 10 mM Tris HCl pH 10, 1 % Sodium Lauryl Sarcosinate, 1 % Triton-X-100; pH 10) stellen, Inkubation bei 4°C, ü.N.

Entfernung nukleärer Protein: Objektträger in Lysis-Puffer II (2,5 M NaCl, 100 mM NaEDTA, pH 10, 10 mM Tris/HCl steril) stellen, Inkubation: 37°C, 1 h, im Dunkeln.

Elektrophorese: 1 l Elektrophoresepuffer (pH > 13), 300 mM NaOH, 2 % DMSO, 10 mM Na₄EDTA frisch ansetzen (ca. 30 min bei 4°C vorkühlen), langsam in die Kammer füllen, so daß keine Luftblasen entstehen. Rührer dabei anschalten, Objektträger hineinlegen, 20 min equilibrieren (DNA-Entwindung), bei 24 V, 4°C, 30 min laufen lassen.

Neutralisation, Dehydration und Präzipitation: 5 ml Ammoniumacetat (10 M) + 45 ml 100 % EtOH, Inkubation für 30 min bei RT

Dehydration: ü.N. in 100 % EtOH, RT

Rehydration: 5 min in 70 % EtOH, RT; OT. trocknen und bis zur Färbung in Schachtel aufbewahren;

Färbung mit SYBR-green: 1x 15 min in H₂O bidest, danach 50 µl Färbelösung (950 µl H₂O, 60 µl DMSO, 200 µl Vectashield, 1 µl SYBR- green) auf Zellen auftragen und mit Deckglas abdecken, sofort auswerten (anschließend in feuchter Kammer bei 4 °C aufbewahren)

6. Immuncytologischer Assay für 8-oxo-Guanin (nach P. Nehls, Fi. Rubikon AG)

Schritte	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1. Waschen mit 2 x SSC	15	4
2. RnaseA-Verdau (auftropfen)	60	37
3. Waschen mit NaCl (0,14 M)	10	4
4. Denaturierungslösung	5	4
5. Neutralisieren mit PBS	5	4
6. Pepsin-Verdau (0,5 g/100 ml) (auftropfen)	4,5	37
7. Waschen mit Hanks	3 x kurz	eiskalt
8. Waschen mit PBS / 1 % BSA	1 x 5; 2 x 3	4

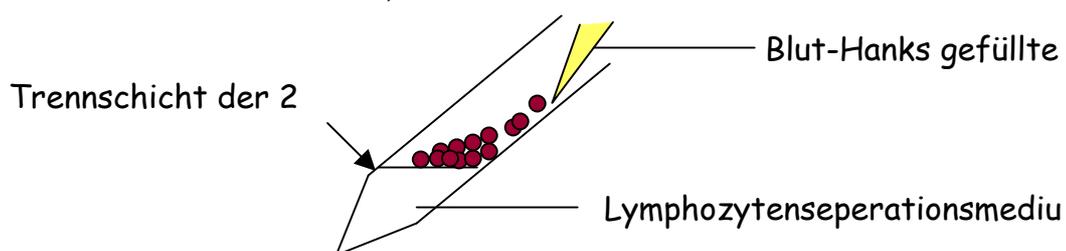
9. Waschen mit PBS / 10 % BSA (auftropfen)	20	4
10. Bindung mit 1. Antikörper (auftropfen)	über Nacht	4
11. Waschen mit PBS	2 x 15	4
12. Waschen mit PBS / 1 % BSA	15	RT
13. Bindung 2. Antikörper 1:200 (auftropfen)	45	37
14. Waschen mit PBS	3 x 10	RT
15. TOTO3-Färbung	10	RT
16. Waschen mit PBS	3 x 5	RT
17. Eindecken mit Mounting-Medium		RT

7. Aufbereitung des Spenderblutes und Lymphozyten-Abtrennung

Verbrauchsmaterial: 50 ml Falcon (Abfallgefäße), 15 ml Falcons, 10 ml Spitzröhrchen 10 ml, 5 ml Plastikpipetten, Eppis, Kryo-Gefäße

Vorbereitung: Hank's ohne Phenolrot (HBSS w/o phenol red) zu je 3 ml in 15 ml Falconröhrchen portionieren und im Kühlschrank lagern – vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen, Lymphozytenseparationsmedium zu je 3 ml in Spitzröhrchen portionieren und im Kühlschrank lagern – vor Gebrauch auf RT bringen.

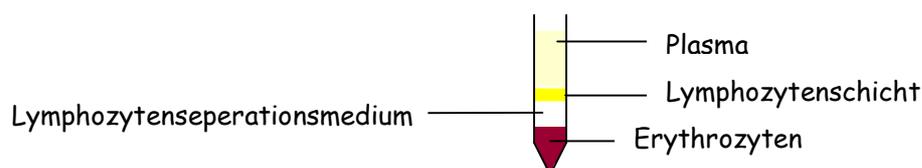
Lymphozytenabtrennung: Patient in Laborbuch eintragen, Blut 1:1 mit Hank's im Falconröhrchen verdünnen (Bsp.: 3 ml Blut + 3 ml Hank's) – Blut dementsprechend aufteilen (bei 10 ml Blut 3 Falconröhrchen), jeweils 3 ml Lymphocytenseparationsmedium mit max. 7 ml Blut- Hank's-Gemisch überschichten, dabei die Blut-Hank's-Lösung schräg an der Röhrchenwand auf die Lymphocytenseparationsmediumoberfläche herunterrinnen lassen, um eine Durchmischung zu vermeiden!!!! Es sollten 2 scharf getrennte Phasen zu erkennen sein. (Phasen nicht durchmischen)



Zentrifugieren bei 1500 Upm, 30 min, RT.

Währenddessen das Einfriermedium herstellen: 700 µl RPMI-Medium, 200 µl FKS (20 % Endkonz.), 100 µl DMSO (10 % Endkonz.) - immer frisch auftauen, kühl lagern.

Lymphozytenschicht abnehmen (ohne Lymphocytenseparationsmedium) und in Spitzröhrchen überführen und 1:1 mit Hank's mischen.



Zentrifugieren bei 1500 Upm, 30 min, RT; Überstand bis auf kleinen Rest verwerfen und das Pellet im Restserum (Hank's) resuspendieren (unbedingt poolen), 5 ml Hank's zugeben (Waschschritt) und gut, aber vorsichtig mischen. 10 µl zur Zellzahlbestimmung abnehmen. Zentrifugieren bei 1000 Upm, 15 min, RT; Überstand abnehmen und bei für je 3 ml Ausgangsvolumen Blut 1 ml Einfriermedium zufügen und in Kryoröhrchen überführen (bei 10 ml Ausgangsblutmenge – 3 Kryoröhrchen mit je 1 ml Einfriermedium), langsam einfrieren.

Zellzahlbestimmung: 10 µl Zell-Lösung mit 10 µl Trypanblau mischen, dann mehrere Quadrate der Neubauer-Kammer im Mikroskop auszählen:

$$\text{Zellzahl/ } \mu\text{l} = \frac{\text{Gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10000 \times 2}{1000}$$