Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

Ermittlung von molekularen Parametern, die zelluläre und klinische Strahlenempfindlichkeit verursachen – Vorhaben 3605S04467

Auftragnehmer:
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

P. Schmezer

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Bundesamt für Strahlenschutz

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

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

BfS-RESFOR-14/09

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2009042384

Salzgitter, August 2009

Schlussbericht
FuE Vorhaben StSch 3605S04467

Thema: Ermittlung von molekularen Parametern, die zelluläre und klinische Strahlenempfindlichkeit verursachen

Laufzeit: 1.10.2005 bis 30.6.2008

Forschungsnehmer: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Teilnehmer:
Dr. P. Schmezer (*Projektkoordinator*)
Abtl. Epigenomik und Krebsrisikofaktoren,
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Prof. Dr. N. Willich
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
Universitätsklinikum Münster

Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
Institut für Strahlenbiologie,
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg

Dr. E. Fritz
Fritz-Lipmann-Institut (FLI)
Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena

Das diesem Bericht zu Grunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit unter dem Förderzeichen 3605S04467 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ... 3
Summary ... 3
Kurzfassung ... 4
I. Kurzdarstellung der Vorgaben ... 6
I.1. Aufgabenstellung ... 6
I.2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde ... 8
I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens ... 9
I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde ... 9
II. Eingehende Darstellung der einzelnen Projektteile ... 11
II.1. Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie Universitätsklinikum Münster ... 11
II.1.1 Erzielte Ergebnisse ... 11
II.1.1.1 Patientenrekrutierung ... 11
II.1.1.2. Isolierung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut ... 16
II.1.1.3. Apoptose-Messung ... 17
II.1.1.3.1 Zelltod in primären Lymphozyten ... 20
II.1.1.3.2 Zelltod in lymphoblastoiden Zelllinien ... 24
II.1.2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse ... 25
II.1.3. Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen ... 26
II.2. DKFZ Heidelberg ... 27
II.2.1. Erzielte Ergebnisse ... 27
II.2.1.1. Zellkultur und Strahlenbehandlung der Zellen ... 27
II.2.1.2. Comet-Assay ... 27
II.2.1.3. Genexpressionsuntersuchungen ... 36
II.2.2 Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen ... 46
II.3. Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München ... 48
II.3.1. Erzielte Ergebnisse ... 48
II.3.1.1. Analyse der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-Kapazität nach *in vitro*-Bestrahlung ... 48
II.3.1.2 Analyse der Apoptose-Induktion nach in vitro-Bestrahlung ... 51
II.3.1.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ... 56
II.4. Leibniz-Institut für Altersforschung – FLI Jena ... 58
II.4.1. Erzielte Ergebnisse ... 58
II.4.1.1. Apoptose ... 58
II.4.1.2. H2AX-Phosphorylierung ... 65
II.4.1.2.1. FACS-Analyse ... 65
II.4.1.2.2. Mikroskopische Analyse: ... 74
II.4.2. vorraussichtlicher Nutzen ... 75
II.4.3. bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen ... 77
II.5. Interlaborvergleich – IMIB Münster ... 79
II.5.1. Apoptose ... 79
II.5.2. γH2AX ... 88
II.5.3. Comet Assay ... 96
II.5.3.1 Olive Tail Moment (OTM) ... 96
II.5.3.2 Tail DNA (%) ... 104
II.5.4. Kurzzusammenfassung ... 111
III. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen ... 115
IV. Literatur ... 115
V. Anlagen ... 119
Tabelle: Strahlenabhängige Regulation der Genexpression ... 120
Erfolgskontrollbericht ... 126

Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurde an einem Kollektiv von 15 klinisch strahlenempfindlichen und 15 dazu passenden klinisch unauffälligen Strahlentherapiepatienten die Assoziation der klinischen Reaktion auf die Bestrahlung mit verschiedenen zellulären Biomarkern untersucht. Unter Beteiligung von 5 Labors wurden mit standardisierten Versuchsprotokollen in einem Ringversuch verschiedene molekulare Parameter sowohl in primären Zellen der Patienten als auch in daraus generierten permanenten Zelllinien vergleichend analysiert. Mit den angewendeten Testsystemen konnten innerhalb des Probenkollektivs deutliche interindividuelle Unterschiede bezüglich DNA-Reparaturkapazität und Apoptose-Induktion nach ionisierender Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Zelllinien unterschieden sich in allen untersuchten Endpunkten deutlich von den primären Zellen und sind somit nur bedingt als Ersatz für primäre Zellen in mechanistischen Untersuchungen zur klinischen Strahlenempfindlichkeit geeignet.

Beim Vergleich der *in vitro*-Daten mit den klinischen Befunden konnte in einzelnen Untersuchungen zwar eine Korrelation festgestellt werden. Generell scheint jedoch keines der untersuchten zellulären Verfahren für einen Einsatz zur Vorhersage der erwarteten klinischen Reaktion geeignet zu sein. Durch genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays konnten hingegen ein Satz von ca. 70 Markergenen identifiziert werden, deren Strahlenreaktion sich in Lymphozyten von strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten unterschieden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines prädiktiven Tests müssen diese erfolgsversprechenden Befunde aus den Genexpressionsanalysen jetzt nachfolgend in einem größeren Kollektiv validiert werden.

Summary

Within the framework of this project, the clinical reaction in response to radiotherapy was compared with several cellular biomarkers in 15 matched sample pairs (radiosensitive and normal reacting radiotherapy patients). Using standardised assay protocols, different molecular parameters were compared in patients' primary cells and thereof generated immortalised cell lines by five research groups in a ring study. Considerable interindividual differences in radiation-induced DNA repair and apoptosis could be detected with the applied test systems. The cell lines significantly differed from the primary cells in all investigated endpoints. Thus, their suitability as surrogate for primary cells in mechanistical studies on clinical radiosensitivity is rather limited.

The comparison of *in vitro* results with clinical data showed correlations in individual investigations. None of the cellular test systems investigated here seems however appropriate for a general application to predict the clinical reaction during or after radiotherapy. On the other hand, the genome-wide expression analysis using microarrays revealed a set of roughly 70 marker genes, which showed different radiation response in lymphocytes of radiosensitive and normal reacting patients. With regard to the development of a predictive assay, these promising results from the gene expression analyses warrant validation in larger cohorts.

Kurzfassung

Mehr als 50% der Tumorpatienten werden strahlentherapeutisch behandelt. Während die Therapie im allgemeinen toleriert wird, entwickeln 5-10% der Patienten starke unerwünschte Nebenwirkungen. Die Ursachen für diese interindividuellen Unterschiede in der Strahlenreaktion sind nicht geklärt und es gibt nach wie vor keine geeignete Methode, die Reaktion im Vorfeld einer Strahlentherapie verlässlich zu ermitteln. In mehreren durch das Bundesamt für Strahlenschutz geförderten Forschungsprojekten (StSch 4211, StSch 4212, StSch 4233, StSch 4360, StSch 4362) wurden zell- und molekularbiologische Grundlagen der individuellen Strahlenempfindlichkeit untersucht. Es resultierten Ergebnisse, die im einzelnen überzeugen, die jedoch z.B. aufgrund der Heterogenität der Patientengruppen oder der geringen Korrelation des gewählten biologischen Endpunktes mit den strahlenbedingten Nebenwirkungen weiterhin viele Fragen offen lassen. Eine Kernfrage ist, welche molekularen Mechanismen der klinisch nachgewiesenen unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit von Patienten zugrunde liegen. Man kann davon ausgehen, dass die Strahlenempfindlichkeit ein komplexer, durch zahlreiche Gene kontrollierter Phänotyp ist und daher multiparametrische Laboranalysen die klinischen Effekte besser abbilden als einzelne Biomarker. Im hier zusammengefassten Forschungsvorhaben sollten deshalb aus einer größeren Zahl möglicher Biomarker diejenigen ermittelt werden, die möglichst sensitiv und für eine (klinische) Anwendung bei hohen Probenzahlen geeignet sind, mit dem Ziel durch eine möglichst optimale Kombination von experimentellen Parametern, die Vorhersage bzw. Identifikation von Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit zu ermöglichen.

Im Rahmen des Projektes wurden 15 klinisch strahlenempfindliche Patienten und dazu 15 passende („gematchte“), aber klinisch unauffällige Patienten bezüglich des Musters der zellulären Strahlenempfindlichkeit umfassend charakterisiert. Hierfür wurde eine Subgruppe von Patienten ausgewählt, die im Projekt StSch 4362 als klinisch strahlenempfindlich bezüglich der akuten Reaktion identifiziert worden waren. Unter Beteiligung mehrerer Labors wurde die Strahlenempfindlichkeit der Patienten multiparametrisch charakterisiert. Hierbei wurde (i) identisches primäres Zellmaterial von verschiedenen molekularen Seiten betrachtet, (ii) die einzelnen Methoden und Versuchsprotokolle in unterschiedlichen Labors abgeglichen und standardisiert, und (iii) die primären Patientenzellen durch EBV-Transformation immortalisiert und so Zelllinien für vergleichende Untersuchungen etabliert.

Im einzelnen wurden in den Patientenzellen für folgende Biomarker Assoziationen mit dem klinischen Endpunkt untersucht. (A) Als ein Maß für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit wurde die Steigerung der Apoptoserate in 3 Labors gemessen. (B) Mittels Comet-Assay wurden DNA-Hintergrund-Schaden, induzierter DNA-Schaden nach *in vitro*-Bestrahlung sowie die DNA-Reparaturkapazität nach 15 und 60 min als zellulärer Marker für Strahlensensitivität evaluiert. (C) Als weiterer Marker, der spezifisch Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erfasst, wurde die Phosphorylierung von H2AX bestimmt. (D) Unter der Annahme einer genetischen Prädisposition für die zelluläre Antwort auf Bestrahlung, wurden genomweite Expressionsprofile in bestrahlten und nicht exponierten Zellen erstellt. Das Ziel war hierbei, Markergene zu finden, deren strahleninduzierte Veränderungen sich in strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten unterscheiden.

Mit den im Vorhaben angewendeten Testsystemen konnten innerhalb des Probenkollektivs deutliche interindividuelle Unterschiede bezüglich DNA-Reparaturkapazität und Apoptoseinduktion nach ionisierender Bestrahlung nachgewiesen werden, wobei mit allen Verfahren eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung gezeigt werden konnte.

Der Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen zeigte bei allen untersuchten Endpunkten, dass sich die beiden Zellsysteme deutlich voneinander unterscheiden und die EBV transformierten Zelllinien nur bedingt als Ersatz für primäre Zellen in mechanistischen Untersuchungen zur klinischen Strahlenempfindlichkeit geeignet sind.

Beim Vergleich der *in vitro*-Daten mit den klinischen Befunden konnte in einzelnen Untersuchungen zwar eine Korrelation festgestellt werden. Eine durchgehende statistische Signifikanz beim Vergleich der Labor-Ergebnisse mit den beobachteten klinischen Ausprägungen konnte jedoch für keinen der eingesetzten zellulären Tests gezeigt werden. D.h. ein eindeutiger Marker zur Identifizierung strahlenempfindlicher Patienten konnte am vorhandenen Kollektiv im Rahmen dieses Projektes weder mit dem Comet-Assay noch mit der Bestimmung von γ-H2AX oder der Apoptoserate gefunden werden. Trotz weitreichender Harmonisierung der Laborprotokolle fanden sich beim Interlaborvergleich große systematische Unterschiede und damit nur geringe Korrelationen der gemessenen Einzelwerte. Für einen Einsatz im Rahmen eines prädiktiven Tests zur Vorhersage der erwarteten klinischen Reaktion während oder nach therapeutischer Bestrahlung scheint demnach keines dieser Verfahren geeignet zu sein.

Durch die genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays konnten jedoch Markergene identifiziert werden, deren Strahlenreaktion sich in Lymphozyten von strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten unterscheiden. Es handelt sich hierbei um Expressions-Unterschiede in einem Satz von 67 Genen, von denen ein erheblicher Teil funktionell zur Gruppe der Apoptose- und Zellzykluskontroll-Gene gehört. Da im Rahmen dieses Forschungsvorhabens eine breit gefasster Satz an Labor-Parametern an einem relativ kleinen Patienten-Kollektiv untersucht wurde, müssen im Hinblick auf die Entwicklung eines prädiktiven Tests die erfolgsversprechenden Befunde aus den Genexpressionsanalysen nachfolgend in einem größeren Kollektiv validiert werden.

I. Kurzdarstellung der Vorgaben

I.1. Aufgabenstellung

Kernfrage des Forschungsvorhabens war, welche molekularen Mechanismen einer klinisch nachgewiesenen unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit von Patienten zugrunde liegen. Aus einer größeren Zahl möglicher Biomarker sollten diejenigen ermittelt werden, die möglichst sensitiv und für eine klinische Anwendung bei hohen Probenzahlen geeignet sind. Im Rahmen dieses Projektes wurden 15 klinisch strahlenempfindliche Patienten und 15 vergleichbare („gematchte“) klinisch unauffällige Patienten bezüglich des Musters der zellulären Strahlenempfindlichkeit umfassend charakterisiert. Dazu wurde eine Subgruppe von Strahlentherapie-Patienten ausgewählt, die im Projekt StSch 4362 als klinisch strahlenempfindlich bezüglich der akuten Reaktion identifiziert worden waren. Zu jedem empfindlichen Patienten wurde ein bezüglich der Risiken vergleichbarer Patient gesucht (matched-pair-Analyse), bei welchem die gleichen biologischen Endpunkte bestimmt wurden. Ziel war die molekulare Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit der Patienten mit mehreren Endpunkten, da man davon ausgehen kann, dass multiparametrische Laboranalysen die klinischen Effekte besser abbilden. Es wurden sowohl Assays zum selben Endpunkt (z.B. Comet-Assay, Apoptose) durchgeführt, um Entscheidungen über optimale Sensitivität zu ermöglichen, aber auch neue Assays im Vergleich zu bisherigen Testverfahren (z.B. Histon H2AX-Phosphorylierung im Vergleich zu Comet Assay). Durch EBV-Transformation wurden von allen 30 Patienten lymphoblastoide Zelllinien hergestellt. Die einzelnen Parameter wurden vergleichend an primären und an immortalisierten, kultivierten Zellen der Patienten

durchgeführt. Eine Gruppe von 15 Personen (gematcht nach Alter und Geschlecht), die keine Krankheitsgeschichte hatten (KORA), dienten als Kontrollen. Mit dem Ziel, Gen-Marker einer genetischen Prädisposition für klinische Strahlenempfindlichkeit zu ermitteln, wurde von den primären Lymphozyten der Patienten sowie den daraus generierten Zelllinien genomweite Expressionsprofile nach *in vitro* Bestrahlung erstellt. Dabei wurden die entstanden Profile von Patienten, die mit deutlichen Nebenwirkungen auf die Bestrahlung reagierten und normal reagierenden Patienten verglichen.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Das Projekt wurde als Ringversuch an 4 verschiedenen Zentren und in Kooperation mit dem Labor der BfS München durchgeführt, in dem die beteiligten Arbeitsgruppen identisches Patienten-Material mit abgeglichenen und standardisierten Versuchsprotokollen von verschiedenen molekularen Seiten betrachten sollten. Die Projektleitung hatte P.Schmezer vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ). Die Rekrutierung der Patienten sowie die Blutabnahme erfolgten an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Münster (UKM) und wurde von T.Bölling koordiniert. Die strahlenbiologischen Untersuchungen zur Apoptose-Induktion wurden zum einen von B.Greve am Institut für Strahlenbiologie des UKM durchgeführt. Vergleichende Untersuchungen zu diesem Biomarker wurden unter der wissenschaftlichen Leitung von E.Fritz am Leibniz-Institut für Alternsforschung (FLI) in Jena sowie unter der Leitung von F.Eckardt-Schupp am Institut für Strahlenbiologie des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Beide Gruppen haben als zusätzlichen Endpunkt Phopsphorylierung von γH2AX analysiert. Die Untersuchungen zur zellulären Strahlenempfindlichkeit und zur DNA-Reparaturkapazität mittels Comet-Assay sowie die Erstellung genomweiter Genexpressionsprofile wurde am Institut für Epigenomik und Krebsrisikofaktoren des DKFZ Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von P.Schmezer und C.Mayer durchgeführt. Vergleichende Comet-Assay-Analysen wurden im Kooperation mit U.Rössler, strahlenbiologisches Labor des Bundesamts für Strahlenschutz in München, erarbeitet. Die Immortalisierung der primären Blutlymphozyten durch EBV sowie die Überlassung von 17 Kontroll-Zelllinien (KORA) erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit T.Illig am Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München.

Die biostatistische Auswertung der Gesamtstudie wurde durch S.Amler und C.Sauerland vom Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik (IMIB) vorgenommen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster genehmigt (Reg.Nr.5IVWillich).

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Während der Projektlaufzeit wurden 6 Treffen mit allen teilnehmenden Gruppen organisiert, um einen möglichst reibungslosen Ablauf zu gewährleisten. Hierbei wurden zunächst Details zur Probenrekrutierung, -entnahme und –verteilung unter den teilnehmenden Gruppen sowie zur Art der Kryokonservierung sowie die Abläufe der Immortalisierung der Zellen durch EBV-Transformation vereinbart. Schwerpunkt einer solchen Projekt-Besprechung war auch der Austausch und die Harmonisierung der Laborprotokolle, um experimentelle Schwankungen zwischen den Labors möglichst gering zu halten. Dieser Abgleich fand auch durch gegenseitige Laborbesuche der Gruppen, die die gleichen Labor-Parameter analysierten, statt. Zum Zweck der späteren Vergleichbarkeit der experimentellen Daten wurde vereinbart, eine Zelllinie aus der KORA-Kontrollgruppe (= Kontrollzellen) als internen Standard zu definieren und diesen bei allen Untersuchungen mitzuführen.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Bei der Strahlentherapie von Patienten mit bösartigen Erkrankungen zeigt ein Teil der Patienten besonders frühe und/oder besonders schwere Nebenwirkungen an den bestrahlten Normalgeweben. Dies ist zum Teil durch äußere Einflussfaktoren bestimmt (so zum Beispiel an der Mundschleimhaut durch exogene Noxen wie Rauchen, Alkohol, scharfe Speisen, exzessive Pflege) oder zum Teil erkrankungsbedingt (vorbestehende Organerkrankung, Diabetes, Anämie) (Baumann, 1995). Es verbleibt ein Anteil von 5-10% der Patienten, bei denen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit ohne erkennbare Ursache vorliegt.

Wäre es möglich, die Patienten mit hoher Strahlensensibilität anhand einer Blutprobe zu identifizieren, so hätte dies Konsequenzen in verschiedenen Bereichen. Zum einen könnten durch ein Screening aller Patienten vor Beginn ihrer notwendigen Bestrahlung überempfindlichen Patienten erkannt und zur Vermeidung von Bestrahlungspausen mit den bekannten negativen Folgen auf die Tumorkontrolle mit a) einer intensiveren Prophylaxe und frühzeitigen therapeutischen Interventionen, b) eventuell geänderter Fraktionierung oder c) geänderter Enddosis behandelt werden. Sie würden aus Dosisintensivierungsstudien ausgeschlossen, und könnten nicht zuletzt über ihr erhöhtes Risiko informiert werden, was für den einzelnen Patienten ein zusätzlicher Punkt in der Entscheidung für oder gegen bestimmte Therapieoptionen sein könnte. Bei wenig empfindlichen Personen ohne Risikofaktoren könnte hingegen eine Dosissteigerung in Erwägung gezogen werden (Tucker et al, 1996).

Bei *in vitro* Untersuchungen bestrahlter und unbestrahlter Proben von Patienten mit auffälligen Strahlenreaktionen (z.B. Budach et.al. 1998, Borgmann et al. 2002) und genetischen Strahlenempfindlichkeitssyndromen zeigt sich ein ganzes Spektrum von Reaktionen, die scheinbar mit der klinischen Empfindlichkeit korrelieren. In verschiedenen Einzelprojekten wurde in den vergangenen Jahren durch das Bundesamt für Strahlenschutz versucht, dies auf klinischer Ebene nachzuvollziehen. Es resultierten Ergebnisse, die im einzelnen überzeugen (s. Abschlussberichte zu StSch 4212, 4233 und 4362), die aber aufgrund der Heterogenität der untersuchten Patientengruppen und der verschiedenen Ansätze weiterhin viele Fragen offen lassen.

Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen gibt es möglicherweise eine Abhängigkeit des Vorhersagewertes bezogen auf den jeweils gewählten Endpunkt (wenn die Zielzellen der Bestrahlungsnebenwirkung anders reagieren als die Lymphozyten, Dörr 1998), zum anderen muss eine ausreichende Zahl von normal reagierenden und strahlenempfindlichen Patienten erfasst werden. Weiterhin ist die systematische, detailgenaue und objektive Dokumentation klinischer Nebenwirkungen schwieriger als zunächst anzunehmen und Quelle zahlreicher systematischer Fehlermöglichkeiten (Riesenbeck, 1998). Ein weiteres Problem besteht in der Definition der Strahlenempfindlichkeit eines Patienten. Im klinischen Sprachgebrauch ist es die frühe oder besonders schwere Strahlenreaktion, die den allgemeinen Erfahrungen widerspricht und damit eine erhöhte Empfindlichkeit nahe legt. Es ist aber in bisherigen Veröffentlichungen nicht ausreichend nachgewiesen, ob diese vom behandelnden Arzt subjektiv ausgesprochene Beurteilung immer mit der dokumentierten Toxizität bzgl. Schweregrad und Zeitpunkt des Auftretens übereinstimmt.

Der erwartete Nutzen des als Ringstudie konzipierten Projekts unter Teilnahme von klinischen, molekularbiologischen sowie biostatistischen Arbeitsgruppen liegt in der Erarbeitung einer möglichst optimalen Kombination von experimentellen Parametern, die eine Vorhersage bzw. Identifikation von Patienten mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit erlaubt.

II. Eingehende Darstellung der einzelnen Projektteile

II.1. Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie Universitätsklinikum Münster

II.1.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1.1 Patientenrekrutierung

Gemäß Vorgabe aus dem Forschungsantrag wurde aus dem Vorgänger-Projekt StSch4362 eine Subgruppe von Patienten ausgewählt, die als klinisch strahlenempfindlich bezüglich der akuten Reaktion identifiziert wurden. Eingeschlossen wurden PatientInnen mit soliden Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (HNO) und mit Mammakarzinomen. Zielorgan der Beurteilung der klinischen Strahlenempfindlichkeit war die Haut im Bestrahlungsfeld, im Fall von Bestrahlungen im Kopf-Hals-Bereich zusätzlich die Schleimhaut von Mund und Rachen. Die Klassifikation der akuten Nebenwirkungen erfolgte prospektiv nach den Kriterien der RTOG/EORTC – Klassifikation (Literatur s.u.), als empfindlich definiert wurden bereits im Vorgängerprojekt StSch 4362 PatientInnen bei Erfüllung eines der folgenden Kriterien, wenn keine erkennbare klinische Ursache dafür vorlag:

HNO-Tumore:

Grad I Reaktion bei weniger als 14 Gy

Grad II Reaktion bei weniger als 30 Gy

Grad III Reaktion nach mehr als drei Wochen Therapiepause/nach Therapie

Mammakarzinome:

Grad I Reaktion bei weniger als 10 Gy

Grad II Reaktion bei weniger als 20 Gy

Grad III Reaktion an der Fläche der Brust

Diese Einteilung wurde unverändert für das Folgeprojekt übernommen. Zu jedem empfindlichen Patienten wurde im Nachfolgeprojekt ein bezüglich der Risiken vergleichbarer Patient aus dem Patientenpool des Vorgängerprojektes gesucht („matched-pair“-Analyse). Dabei wurde auf die Datenbank der Patienten aus dem Projekt StSch 4362 zurückgegriffen. Kriterien für die Bildung der entsprechenden Paare waren zwingend die Übereinstimmung von Geschlecht und Tumorerkrankung (HNO/Mamma) sowie ein Maximum der Übereinstimmung folgender weiterer Parameter:

Patientinnen mit Mammakarzinom:

Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung, Bestrahlungsdosis, Ausmaß der Bestrahlungsfelder (Bestrahlung des Lymphabflussgebiete ja/nein), durchgeführte Operation (brusterhaltende

Therapie vs. Ablatio), Durchführung einer Chemotherapie, Durchführung einer antihormonellen Therapie, TNMG-Klassifikation des Tumors, Größe und Gewicht (bei Primärtherapie), Nikotin-/Alkoholkonsum.

PatientInnen mit HNO-Tumoren:

Alter zum Zeitpunkt der Bestrahlung, Bestrahlungsdosis, durchgeführte Operation (Neck dissection ja/nein), Durchführung einer Chemotherapie, TNMG-Klassifikation des Tumors, Größe und Gewicht (bei Primärtherapie), Nikotin-/Alkoholkonsum.

Die entsprechenden Patienteneigenschaften zeigt Tabelle II.1.1.

Im Rahmen des Projektes StSch 4362 erfolgte eine intensive Dokumentation von Basisdaten der Patienten und möglichen Einflussfaktoren für Nebenwirkungen und experimentelle Untersuchungen. Dazu gehörten:

- Komorbidität und Medikamenteneinnahme
- Tumorcharakterisierung
- Vorbehandlung
- Tumorbehandlung bisher
- Strahlentherapie
- Allgemeinzustand, Ernährungszustand, Rauchgewohnheit

Diese Daten wurden nach Eingang aller experimentellen Daten im Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik (IMIB) in Münster allen teilnehmenden Labors für Analysen zur Verfügung gestellt.

ID.	Geb.-Jahr	HNO/ Mamma	empf/ unempf	Rad.-Jahr	w/m	links/ rechts	Ablatio/ BET	SIAX ?	Chemo?	Hormonther.	Boost?/ Dos.ZV	Neck diss.	TNMG	Größe	Gewicht	Karnofsky	Nikotin	Alkohol
1b	1947	Mamma	empfindlich	2004	w	rechts	BET	nein	EC sim	Tamoxifen	IORT		T1N0M0G3	170	91/91	100		
1a	1943	Mamma	unempf.	2003	w	rechts	BET	nein	EC seq.	Novaldex	nein		T2N1M0G2	168	52/50	100		
2b	1947	Mamma	empfindlich	2001	w	rechts	BET	nein	nein	Tamoxifen	66Gy		T1N0M0G1	167	83/83	100		
2a	1963	Mamma	unempf.	2001	w	links	BET	nein	EC seq	Tamoxifen	66 Gy		T2N0M0G2	166	63/63	100		
3a	1957	Mamma	empfindlich	2004	w	rechts	BET	nein	EC seq.	nein	66 Gy		T1N0M0G3	166	60/60	100		
3b	1951	Mamma	unempf.	2004	w	rechts	BET	nein	EC seq.	nein	66 Gy		T2N0M0G2	170	116/116	100		
4b	1935	Mamma	empfindlich	2002	w	rechts	BET	ja	nein	Tamoxifen	nein		T1N0M0G2	171	74/74	100		
4a	1928	Mamma	unempf.	2001	w	links	BET	nein	nein	Tamoxifen	nein		T2N0M0G2	168	75/75	80		
5b	1946	Mamma	empfindlich	2003	w	links	BET	nein	nein	Tamoxifen	nein		T1N0M0G2	168	63/60	100		selten Wein
5a	1938	Mamma	unempf.	2003	w	rechts	BET	nein	nein	Tamoxifen	nein		T1N1M0G2	170	100/100	100		selten Wein
6a	1935	Mamma	empfindlich	2001	w	links	BET	ja	CMF seq	nein	nein		T2N0M0G1	172	75/75	90		
6b	1944	Mamma	unempf.	2001	w		BET	ja	EC seq	nein	nein		T2N2M0G2	165	66/65	90		
7a	1944	Mamma	empfindlich	2003	w	links	BET	ja	CMF sim	nein	IORT		T2N1M0G2	164	79/79	100		
7b	1935	Mamma	unempf.	2003	w		BET	ja	EC+Taxol seq	nein	nein		T1N1M0G3	176	74/73	100		selten Wein
8a	1947	Mamma	empfindlich	2002	w	rechts	Ablatio	ja	EC/CMF seq/sim	nein	60 Gy		T4N1M0G3	162	93/94	100		selten Wein
8b	1932	Mamma	unempf.	2004	w	rechts	Ablatio	ja	CMF seq	Femara	kein		T2N0M0G2	161	64/64	90		selten Wein
9b	1934	HNO	empfindlich	2002	m				nein		66 Gy	ipsilat.	T1N0M0G2	184	100/89	100		
9a	1932	HNO	unempf.	2002	m				nein		60 Gy	ipsilat.	T2N1M0G3	182	72/67	100		
10a	1952	Mamma	empfindlich	2004	w	rechts	BET	nein	nein	Tamoxifen	66 Gy		T1N0M0G3	177	84/83	100	<1Pk/Tag	selten Bier
10b	1956	Mamma	unempf.	2003	w	rechts	BET	nein	nein	Tamoxifen	66 Gy		T1N0M0G2	164	63/63	100	k.A.	selten Wein
11a	1944	HNO	empfindlich	2003	m				nein	nein	60 Gy	ipsilat.	T1N0M0G2	195	85/77	100		
11b	1945	HNO	unempf.	2003	m				nein	nein	66 Gy	ipsilat.	T2N2M0G2	172	84/84	100	>1Pk/Tag	
12b	1951	HNO	empfindlich	2004	m				nein		60 Gy	ipsilat.	TxN1M0G2	176	82/78	100	<1Pk/Tag	selten Bier
12a	1942	HNO	unempf.	2004	m				?		60	ipsilat.	TxN2M0G1	180	81/75	100	k.A.	selten Wein
13b	1936	HNO	empfindlich	2002	w				nein	nein	60 Gy	nein	T4N2M0G2	165	90/81	100		
13a	1938	HNO	unempf.	2004	w				nein	nein	60 Gy	bds.	T2N1M0G3	164	76/74	100	>1 Pk/Tag	
14a	1953	Mamma	empfindlich	2002	w	rechts	BET	ja	nein	nein	IORT		T1N1M0G2	166	83/88	100		
14b	1955	Mamma	unempf.	2002	w	rechts	BET	nein	nein	nein	50 Gy		T1N0M0G1	171	58/58	100	k.A.	selten Wein
15a	1934	HNO	empfindlich	2003	m				nein		60 Gy	ipsilat.	T2N0M0G2	178	90/78	100		
15b	1937	HNO	unempf.	2004	m				Cispl/5-FU		70,2 Gy	nein	T3N2M0G2	178	67/65	100	<1Pk/Tag	k.A.

Tabelle II.1.1: Patienteneigenschaften der gematchten Paare.

Die im Nachfolgeprojekt ausgewählten Patienten wurden zur Nachsorgeuntersuchung einbestellt. Bei Vorstellung erfolgte eine Anamnese bzgl. zwischenzeitlich neu aufgetretener Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, aktueller Tumorkontrolle und zwischenzeitlich durchgeführter zusätzlicher antineoplastischer Therapie. Die Patienten wurden bezüglich der späten Nebenwirkungen beurteilt und diesbezüglich dokumentiert. Es erfolgte die Blutabnahme für das Spektrum der Untersuchungen und der Versand an die beteiligten Labors (detaillierte Beschreibung s. Kapitel zu Probenaufarbeitung). Die Spätreaktionen wurden (wie im Vorgängerprojekt die Akut-Nebenwirkungen) auf dem klinikeigenen Bogen nach EORTC/RTOG-Kriterien notiert, jedoch hier nur mit einer allgemeinen Einteilung für die Schleimhaut, wobei die jeweils stärkste Ausprägung der sichtbaren Schleimhaut dokumentiert wurde. Diese Daten wurden ebenso allen Beteiligten zur Verfügung gestellt. Um allen Beteiligten die klinische Einteilung zu verdeutlichen, wurden im Rahmen eines Projekttreffens am 25.01.2008 in Münster Fotos verschiedener Toxizitäts-Grade aus einem gängigen Lehrbuch demonstriert (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH (Hrsg.): Nebenwirkungen in der Radioonkologie. Klinisches Kompendium. Münchener Medizinische Taschenbücher. München, Urban & Vogel, 2000). CD-ROMs mit den initial im Forschungsvertrag und Antrag vereinbarten Daten sowie den notwendigen Literaturstellen zur Klassifikation der EORT/RTGO bzw. LENT/SOMA-Kriterien wurden allen Beteiligten zur Verfügung gestellt.

Der Vergleich der erhobenen Spät-Toxizitäten mit den ursprünglich dokumentierten Akut-Nebenwirkungen ergab, dass bei den Patientinnen mit Mammakarzinomen in 8 von 10 Paaren und bei HNO-PatientInnen in 4 von 5 Paaren die primär als strahlenempfindlich charakterisierten Patienten deutlich höhere Spät-Toxizitätsraten aufwiesen als die gematchten Kontrollen. Die Unterschiede zwischen den primär empfindlichen und primär unempfindlichen Patienten zeigten bei den späten Nebenwirkungen meist Unterschiede von maximal einem Schweregrad, im Einzelfall jedoch auch bis zu drei Schweregrade.

Eine Übersicht über die erhobenen Spät-Toxizitäten zeigen die Tabellen II.1.2 (Mamma-CA-Patientinnen) und II.1.3 (HNO-PatientInnen).

Pat-ID	Gruppe	Haut-Teleang	Haut-Pigm.	Haut-Ulz.	Haut-Atro	Haut-Fibr	LÖ-Brust	Objekt KE	Sbjekt KE
1a	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1
1b	Empfindlich	1	0	0	1	2	1	2	2
2a	Unempfindlich	0	0	0	0	1	0	1	1
2b	Empfindlich	1	0	0	1	1	1	2	2
3a	Empfindlich	0	0	0	0	1	0	2	2
3b	Unempfindlich	0	0	0	1	1	0	2	2
4a	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1
4b	Empfindlich	2	0	0	2	1	1	2	2
5a	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1
5b	Empfindlich	0	0	0	1	2	2	2	2
6a	Empfindlich	0	0	0	1	1	1	2	2
6b	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1
7a	Empfindlich	1	0	0	2	1	0	2	2
7b	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1
8a	Empfindlich	2	1	0	2	2	0	3	3
8b	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	2	2
10a	Empfindlich	0	0	0	1	1	0	1	1
10b	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	2	2
14a	Empfindlich	3	1	0	2	2	2	3	3
14b	Unempfindlich	0	0	0	0	0	0	1	1

Tabelle II.1.2: Vergleich der Schweregrade der gematchten Mammakarzinom-Patientinnen im Hinblick auf die dokumentierten Spät-Toxizitäten.
(Abkürzungen: Pat-ID = Patienten-Identifikationsnummer, Teleang = Teleangiektasien, Pigm. = Pigmentierung, Ulz. = Ulzeration, Atro = Atrophie, LÖ = Lymphödem, Objekt. KE = Objektives Klinisches Ergebnis, Sbjekt. KE = Subjektives Klinisches Ergebnis.)

PatID	Gruppe	Haut-Teleang	Haut-Pigm.	Haut-Ulz	Haut-Atro	Haut-Fibr	SH	Xero	Phar.	Ern.	LÖ Kopf
9a	Unempfindlich	1	0	1	1	1	1	2	0	2	0
9b	Empfindlich	0	0	0	2	1	2	1	1	0	1
11a	Empfindlich	1	1	0	1	1	1	2	0	0	2
11b	Unempfindlich	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
12a	Unempfindlich	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
12b	Empfindlich	1	1	0	1	1	1	2	1	1	2
13a	Unempfindlich	0	1	0	1	1	1	1	0	1	2
13b	Empfindlich	3	2	0	2	2	2	2	3	2	1
15a	Empfindlich	1	0	0	0	0	3	2	1	2	0
15b	Unempfindlich	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1

Tabelle II.1.3: Vergleich der gematchten HNO-PatientInnen im Hinblick auf die dokumentierten Spät-Toxizitäten.
(Abkürzungen: Pat-ID = Patienten-Identifikationsnummer, Teleang = Teleangiektasien, Pigm. = Pigmentierung, Ulz. = Ulzeration, Atro = Atrophie, Fibr = Fibrose, SH = Schleimhaut, Xero = Xerostomie, Phar. = Pharynx, Ern. = Ernährung, LÖ = Lymphödem)

II.1.1.2. Isolierung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Die Untersuchungen wurden an primären Lymphozyten aus dem peripheren Blut durchgeführt. Dazu wurde jedem Patienten 240 ml Blut unter Zusatz von Heparin (5.000 I.E. auf 50 ml) als Anti-Koagulanz abgenommen. Zusätzlich wurden 10 ml Blut unter Zusatz von EDTA (1,6 mg pro ml) gewonnen und direkt nach München zur Immortalisierung versendet. Nach anfänglichen Verzögerungen beim Versenden durch einen Transportdienst wurde der Transport auf eine andere Logistikfirma umgestellt. Danach funktionierte der Transport problemlos. Für drei fehlerhafte Proben (4b, 7a, 14b) wurde auf die in Münster als Reserve kryokonservierten Lymphozyten zurückgegriffen. Die Beschriftung der Proben erfolgte nach dem zuvor vereinbarten Schema: Die Paare wurden willkürlich von 1-15 durchnummeriert. Bei jedem Paar wurden Probanden der strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten zufällig mit „a“ und „b“

benannt. Für die Zelllinienetablierung erhielten Proben mit Buchstaben „a“ den Buchstaben „c“, Proben mit „b“ entsprechend „d“ (Beispiel: Primäre Zellprobe 1a erhält die Zelllinien-Nummer 1c, 2b erhält 2d etc.).

Die Separation der Lymphozyten erfolgte in Münster durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierzu wurden Lymphosep-Röhrchen (Greiner) mit 15 ml Lymphoprep (MP Biomedicals) beschickt und für 2 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Die so vorbereiteten Röhrchen wurden mit 30 ml der Blutprobe überschichtet und für 15 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Die Lymphozyten konnten als diskrete Bande mit einer Transferpipette (Falcon) abgenommen werden und wurden ein weiteres mal mit 50 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die gereinigten Lymphozyten in 50 ml PBS aufgenommen, gezählt und in Portionen zu je 10×10^6 Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Zellausbeuten der 30 Patienten schwankten deutlich, so dass für einzelne Patienten (15B, 1B und 6B) eine erneute Blutentnahme nötig war.

Die so vorbereiteten Lymphozytenproben wurden an die beteiligten Laboratorien auf Trockeneis verschickt, während des Transportes blieben die in Münster verbliebenen Proben ebenfalls auf Trockeneis, sodass die Transportbedingungen hier simuliert wurden.

II.1.1.3. Apoptose-Messung

<u>Zellkultur</u>

Für die Bestrahlungsexperimente wurden die primären Lymphozyten aufgetaut und mit je 1×10^6 Zellen pro Petrischale (5 cm im Durchmesser) in Kultur genommen. Die Zellen wurden mit 3 ml RPMI (PAA Laboratories) unter Zusatz von 0,1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen) und 20% FCS (PAA Laboratories) versetzt und für 24h kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit Co60-γ-Strahlung eines Telokobalttherapiegerätes (Fa. Philips) der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Münster, bei der jeweils 3 Petrischalen pro Dosispunkt (0Gy, 0,4Gy und 0,8Gy) bestrahlt wurden (Dosisleistung: 2,09 Gy/min). Die Zellen wurden danach für weitere 48h inkubiert.

Markierung apoptotischer und nekrotischer Zellen

Die Differenzierung vitaler und toter Zellen erfolgte mit dem Annexin-V Testkit der Firma Becton Dickinson nach folgendem modifizierten Protokoll:

Die primären Lymphozyten wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in PBS aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 25 µl eines Anti-CD3/CD19 Antikörpergemisches [30 µl CD3-APC, 30 µl CD19-APC (Becton Dickinson), 190 µl PBS] resuspendiert. Im Anschluss an eine 20 minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen in PBS verdünnt, bei 400 x g zentrifugiert und in 100 µl Annexin-Färbelösung (Ansatz lt. Herstellerangabe) resuspendiert. Die Zellen wurden für 15 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 900 µl Annexin-Puffer versetzt und bis zur Messung bei 4 C gelagert.

Durchflusszytometrische Messung

Der Anteil der nekrotischen und apoptotischen Zellen an der Gesamtzellfraktion (20.000 Ereignisse pro Messung) wurde durchflusszytometrisch bestimmt und erfolgte an einem Gerät der Firma Partec (Partec, Münster, Deutschland). Dieses Gerät ist ausgestattet mit einem 488 nm Argon-Festkörperlaser und einer 635 nm Laserdiode. Die Differenzierung lebender und toter Zellen erfolgte durch die Kombination der Annexin-V- und Propidiumjodid-Markierung in einem FL1-FITC (520 nm) / FL3-PI (665 nm) Dotplot. Bei dieser Darstellung erscheinen lebende Zellen im unteren linken Quadranten, apoptotische Zellen im rechten unteren Quadranten und nekrotische Zellen im rechten oberen Quadranten (Abbildung 1). Die Gatingstrategie sah folgendermaßen aus:

Die Lymphozyten wurden über die Streulichteigenschaften FSC (Vorwärtsstreulicht = Größe) /SSC (Seitwärtsstreulicht = granuläre Struktur) eingegrenzt und das Gate auf alle anderen Histogramme übertragen (Backgate). Im Plot SSC gegen FL5-Allophycocyanin (665 nm) wurden die CD3 und CD19 positiven Lymphozyten dargestellt und eingegrenzt. Diese beiden Eigenschaften wurden kombiniert und auf den Plot FL1-FITC (Annexin-V) gegen FL3-PI (Propidiumjodid) angewendet, sodass die lebenden und toten Lymphozyten differenziert werden konnten.

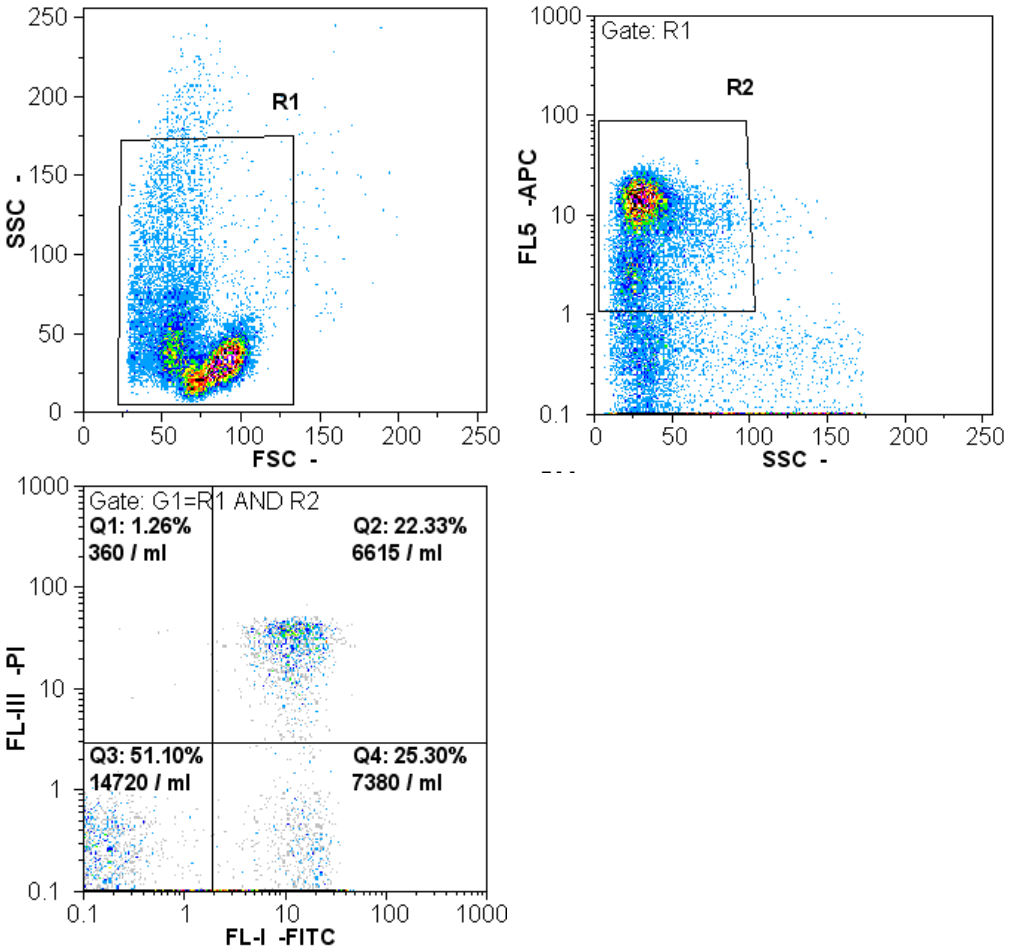


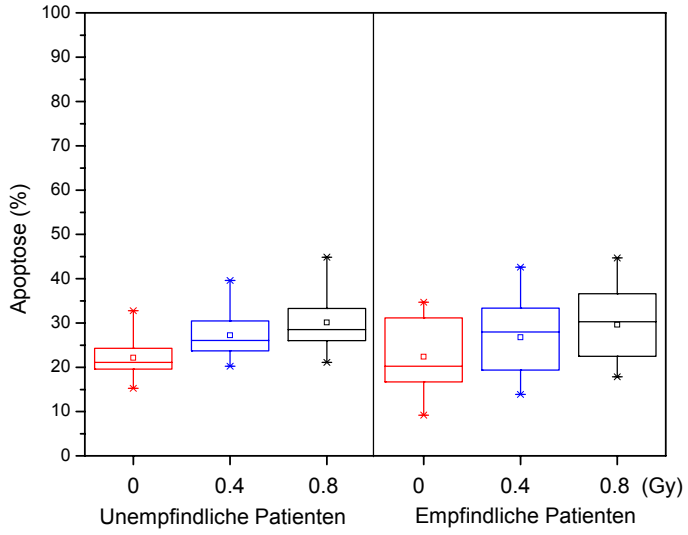
Abbildung II.1.1.: Durchflusszytometrische Messung der apoptotischen Zellen. Die Eingrenzung der Lymphozyten erfolgte im FSC/SSC-Dotplot und über eine Lymphozyten-spezifische Antikörpermarkierung im SSC/FL5-APC-Dotplot. Die Differenzierung vitaler und toter Zellen erfolgte im FL1-FITC/FL3-PI-Dotplot, wobei die vitalen Zellen im unteren linken Quadranten (Q3) erscheinen, die apoptotische Zellen in Q4 und die nekrotischen Zellen in Q2. 2. Ergebnisse

Für die vorliegende Studie wurden 15 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren oder Brustkrebserkrankungen ausgewählt, die während der Strahlentherapie durch besonders frühe und/oder besonders starke Reaktionen des mitbestrahlten Normalgewebes auffielen. Hinzu kamen 15 dazu passende Patienten mit normalen Strahlenreaktionen. Beide Gruppen waren bereits an einer Vorläuferstudie beteiligt. Den Patienten wurde Blut entnommen um an deren Lymphozyten den strahleninduzierten Zelltod als prädiktiven Parameter der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen. Zusätzlich wurden durch eine EBV-Transformation lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) generiert, deren Eignung als Modellsystem für den Parameter Apoptose und für zukünftige prädiktive Marker bestimmt werden sollte. Die Untersuchungen wurden als Ringstudie angelegt und in drei voneinander unabhängigen Laboratorien durchgeführt.

II.1.1.3.1 Zelltod in primären Lymphozyten

Nach der Bestrahlung mit 0 Gy, 0,4 Gy und 0,8 Gy wurden die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert und der Anteil der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Innerhalb der Triplikate zeigte sich nur eine geringe Abweichung der Ergebnisse. Es konnte dosisabhängig ein Anstieg sowohl der nekrotischen als auch der apoptotischen Zellen gefunden werden. Allerdings konnte kein Zusammenhang zum Auftreten besonders früher und/oder starker Nebenwirkungen gefunden werden (Abbildung II.1.2). Dies verdeutlichen auch die Berechnungen der Signifikanzen. Die Daten für Apoptose und Nekrose der strahlenempfindlichen Patienten unterschieden sich bei keinem Dosispunkt von denen der strahlenunempfindlichen gematchten Patienten (Tabelle II.1.4 und II.1.5).

A



B

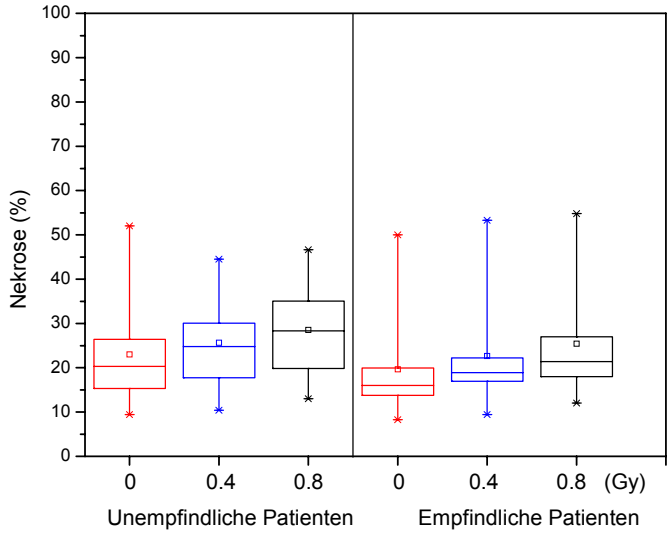


Abbildung II.1.2: Strahleninduzierte Apoptose (A) und Nekrose (B) in Lymphozyten von strahlen-empfindlichen und -unempfindlichen Patienten. In allen Fällen ist ein dosisabhängiger Anstieg zu erkennen. Dieser ist bei den beiden Gruppen aber nicht signifikant unterschiedlich.

Apoptose						
Dosis	**strahlenunempfindlich vs. -empfindlich**					
	0		**0,4**		**0,8**	
Signifikanz Mann-Whitney-U-Test	0,8694		0,8372		0,9345	
Dosis (Gy)	**unempfindlich**			**strahlenempfindlich**		
	0	**0,4**	**0,8**	**0**	**0,4**	**0,8**
Mittelwert	22,12	27,25	30,16	22,40	26,79	29,60
Median	21,12	26,08	28,49	20,23	28,00	30,31
Range	17,51	19,45	23,82	25,51	28,68	26,80
Minimum	15,24	20,25	21,07	9,19	13,90	17,87
Maximum	32,75	39,70	44,88	34,69	42,58	44,67

Tabelle II.1.4: Berechnung der Signifikanz für den Parameter Apoptose nach dem Mann-Whitney-U-Test. Für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der strahlenempfindlichen und unempfindlichen Patienten (signifikant unterschiedlich sind Werte <0,05).

Nekrose						
Dosis	**strahlenunempfindlich vs. -empfindlich**					
	0		**0,4**		**0,8**	
Signifikanz Mann-Whitney-U-Test	0,1948		0,255		0,2087	
Dosis (Gy)	**unempfindlich**			**strahlenempfindlich**		
	0	**0,4**	**0,8**	**0**	**0,4**	**0,8**
Mittelwert	22,96	25,64	28,55	19,66	22,64	25,45
Median	20,31	24,78	28,34	16,04	18,91	21,37
Range	42,62	34,07	33,68	41,78	43,93	42,78
Minimum	9,42	10,42	12,99	8,24	9,44	12,03
Maximum	52,04	44,49	46,66	50,02	53,37	54,81

Tabelle II.1.5: Berechnung der Signifikanz für den Parameter Nekrose nach dem Mann-Whitney-U-Test. Für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der strahlenempfindlichen und unempfindlichen Patienten (signifikant unterschiedlich sind Werte <0,05).

Bei Betrachtung der Absolutwerte erwies sich Probe 3 als auffällig. Die induzierte Apoptose war hier im Vergleich zur gematchten Probe sehr hoch, während es sich bei der induzierten Nekrose genau umgekehrt verhielt. Alle anderen Werte waren unauffällig (Abbildung II.1.3).

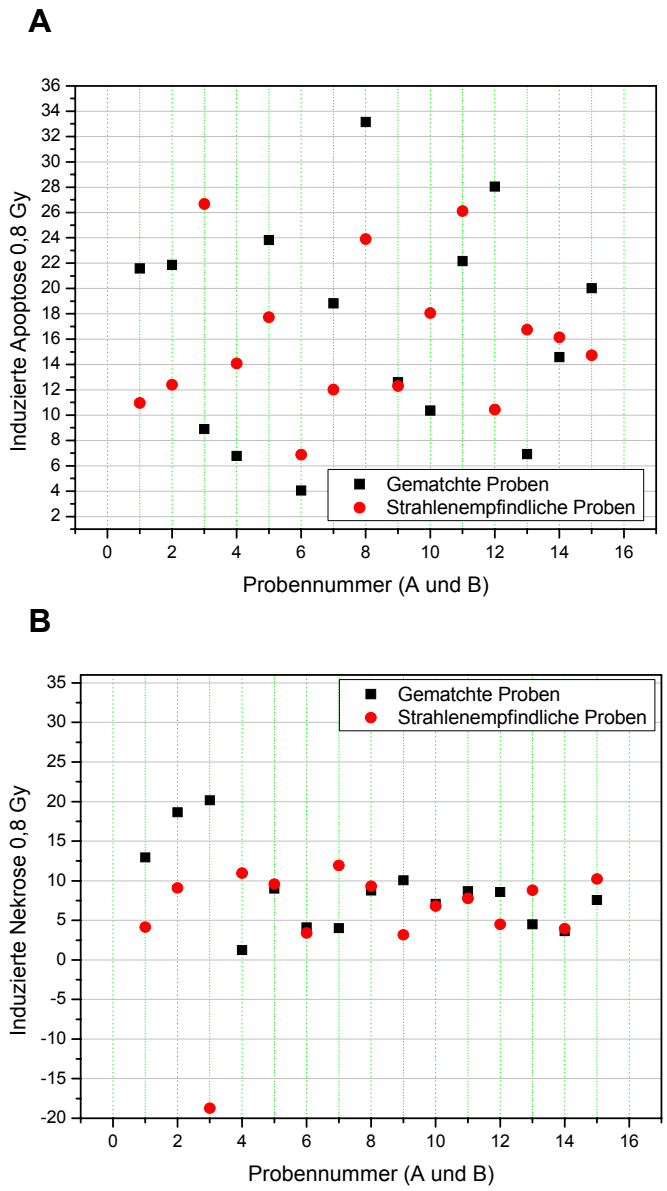


Abbildung II.1.3: Strahleninduzierte (0,8 Gy) Apoptose (A) und Nekrose (B) in primären Lymphozyten von strahlenempfindlichen Personen und strahlenunempfindlichen, gematchten Personen.

II.1.1.3.2 Zelltod in lymphoblastoiden Zelllinien

Die lymphoblastoiden Zelllinien erwiesen sich in den Versuchen als robust und weniger anfällig gegenüber exogenen Einflussfaktoren als die korrespondierenden primären Lymphozyten. Dies äußerte sich in niedriger bzw. nicht vorhandener spontaner Nekrose oder Apoptose. In den Bestrahlungsversuchen wurden die Zelllinien, wie die primären Lymphozyten, mit 0,4 Gy und 0,8 Gy bestrahlt. Allerdings zeigten die Zellen in diesem Dosisbereich weder Apoptose noch Nekrose. Um auszuschließen, dass es sich um Test-spezifische Probleme bei der Darstellung der toten Zellen handelt, wurden andere gängige Apoptose-Nachweisverfahren eingesetzt. Im Einzelnen waren dies die Sub-G1-Peak Analyse und der Tunel-Assay (Molecular Probes, Invitrogen, USA). Beide Nachweisverfahren bestätigten die Ergebnisse des Annexin-V Tests (Abbildung II.1.4). Apoptose konnte in diesen Zellen erst nach signifikant höheren Dosen gemessen werden. Eine lymphoblastoide Zelllinie sollte als interne Kontrolle bei allen Experimenten mitgeführt werden (KORA-Linie), zeigte aber wie alle anderen Zelllinien keinen Zelltod in dem getesteten Dosisbereich. Insofern wurde auf eine interne Kontrolle auch bei der Bearbeitung der primären Lymphozyten verzichtet. Die Bearbeitung der Zelllinien bezüglich Apoptose wurde im gegenseitigem Einvernehmen und in Absprache mit dem BfS nicht weiterverfolgt.

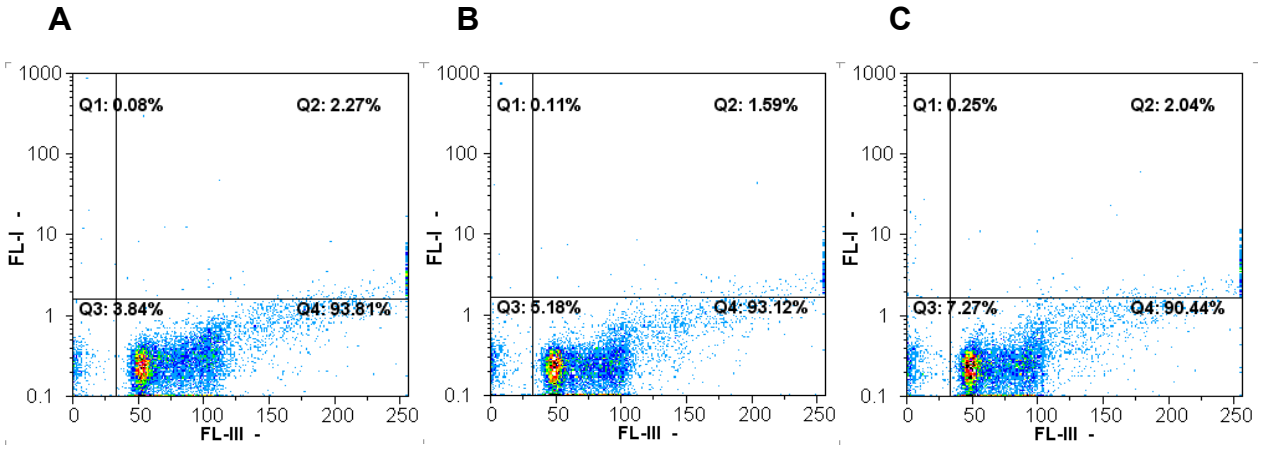


Abbildung II.1.4: Bestimmung der Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien mit Hilfe des Tunel-Assays. Sowohl die unbestrahlte Kontrolle (A) als auch die mit 0,4 Gy (B) und 0,8 Gy (C) bestrahlten Proben zeigten keine Apoptose. Die Ergebnisse stimmen mit denen der anderen Tests überein.

II.1.2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der in vitro gemessene radiogene Zelltod (Apoptose und Nekrose) in primären Lymphozyten und daraus gewonnenen Zelllinien war nicht assoziiert mit dem Auftreten sehr früher und/oder sehr starker Reaktionen des mitbestrahlten Normalgewebes im Rahmen einer Strahlentherapie. Dies ergab die eingehende statistische Auswertung der Daten. Einzelne Werte waren zwar auffällig (Probe 3), zeigten aber im Interlaborvergleich keine Übereinstimmung und müssen insofern kritisch bewertet werden. Die Verwendung lymphoblastoider Zelllinien ist bedenklich, da in dem gewählten Dosisbereich kein Zelltod induziert werden konnte. Diese Zellen sind derart verändert, dass ihre Verwendbarkeit für die Charakterisierung anderer Endpunkte fraglich ist. Insofern eignen sie sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht zur Generierung eines Zellpools aus strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Zellen, der beliebig vergrößert werden kann und für zukünftige Marker eingesetzt werden könnte.

Die Beurteilung des prädiktiven Wertes des radiogenen Zelltods ist aufgrund der geringen Anzahl der strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Probanden in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Diese Studie war jedoch von Beginn an in Form eines Ringversuches angelegt, um die Vergleichbarkeit verschiedener potentieller Untersuchungsverfahren für eine Charakterisierung besonders strahlenempfindlicher Personen zu untersuchen. Einzelne, auffällige Ergebnisse lassen sich so anhand der Daten der anderen Laboratorien überprüft. Um experimentelle Schwankungen auszugleichen, sollte ursprünglich eine interne Kontrolle (KORA-Zellen) mitgeführt werden, die sich im Verlauf der Versuche aber als strahlenresistent erwies und daher nicht weiter bearbeitet wurde. In zwei der drei beteiligten Laboratorien wurde neben der vereinbarten KORA-Kontrolle zusätzlich eine interne Kontrolle bestehend aus primären Lymphozyten mitgeführt, während im dritten Labor jede Probe in drei parallelen Ansätzen bearbeitet wurde und so die experimentellen Schwankungen erkannt und der interne Fehler klein gehalten werden konnte. Da die Zelllinien wie die KORA-Kontrolle mit verschiedenen Protokollen keine verwertbaren Apoptosedaten lieferten, wurden diese nicht weiter bearbeitet und aus dem Teilprojekt Apoptose gestrichen. Als Ergebnis bleibt jedoch festzuhalten, dass die immortalisierten Zelllinien offensichtlich Veränderungen ihrer Zelltodeigenschaften erfahren haben, die ihre Verwendung zur Charakterisierung von Apoptose-Markern der ursprünglichen Zellen verbieten.

Ein direkter finanzieller Nutzen ist aus diesem Vorhaben nicht zu erwarten. Die weitere Forschung auf diesem Gebiet kann aber von den hier gewonnenen Ergebnissen

profitieren, besonders in Bezug auf die Zelllinien-Daten. Darüber hinaus zeigt die Studie, dass Untersuchungen validere Daten liefern, wenn sie in Form einer Ringstudie angelegt werden. Damit lassen sich einzelne auffällige Ergebnisse überprüfen.

II.1.3. Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Im Hinblick auf die Evaluation der induzierten Apoptose bei primären Lymphozyten als potentieller prädiktiver Parameter für Strahlenempfindlichkeit sind uns keine zwischenzeitlich publizierten Arbeiten bekannt. Jedoch gibt es eine Arbeit aus dem Jahre 2005 (Wistop et al.), in der die Strahlen-induzierte Apoptose mittels TUNEL-Assay bei lymphoblastoiden Zelllinien von gesunden Spendern, Tumorpatienten und strahlenempfindlichen Patienten (Patienten mit Strahlenempfindlichkeitssyndromen sowie Patienten mit mindestens später Grad 3-Toxizität) bzgl. ihrer Aussagekraft zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit untersucht wurde. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation gefunden werden. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie, allerdings ist nach unseren Ergebnissen die Verwendung von lymphoblastoiden Zelllinien für die genannte Fragestellung auch nicht zu empfehlen.

Als potentieller Marker für individuelle Strahlenempfindlichkeit wurden mittlerweile chromosomale Deletionen beschrieben (Borgmann et al 2008). In zwei prospektiven Studien wurden 51 Patienten diverser Tumorentitäten bzw. 87 PatientInnen mit Mamma-Karzinomen untersucht. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand von chromosomalen Deletionen in Lymphozyten untersucht, die mit 3 und 6 Gy bestrahlt worden waren. Ein Zusammenhang zwischen akuten Reaktion (klassifiziert nach RTOG-Kriterien) und den Lymphozyten-Ereignissen bei 6 Gy konnte dargestellt werden.

II.2. DKFZ Heidelberg

II.2.1. Erzielte Ergebnisse

II.2.1.1. Zellkultur und Strahlenbehandlung der Zellen

Zellen der „gematchten“ Patientenpaare wurden zur Durchführung der Comet-Assay-Untersuchungen und der Genexpressions-Analysen für jeden Versuchstag vorab in Kultur genommen: primäre Lymphozyten des strahlenempfindlichen bzw. strahlenunempfindlichen Patienten (Proben „a“ und „b“), Zelllinien der gleichen Patienten („c“ und „d“) sowie die zugehörigen Kontrollzellen aus der KORA-Studie und die immer mitzuführende interne Standard-Zelllinie. D.h. jeweils 6 Zell-Proben wurden pro Versuchstag gemeinsam behandelt, um eventuelle versuchsbedingte Schwankungen innerhalb der Gruppe möglichst gering zu halten. Während die primären Lymphozyten 24h vor der Strahlenbehandlung präinkubiert wurden, wurden die Zelllinien 10 Tage vorab in Kultur genommen und nach dem an alle Gruppen verteilten Protokoll kultiviert. Die Strahlenbehandlung wurde für die beiden durchzuführenden Assays (COMET–Assay und Expressionsanalyse) zeitgleich am selben Zellmaterial durchgeführt, d.h. die für die spätere RNA-Isolierung bestimmten Zellen wurden zusammen mit den in Agarose auf Objektträgern eingebetteten Zellen mit 5Gy bestrahlt. Die Dosisleistung der Bestrahlungsanlage mit einer ^{137}Cs-Strahlenquelle beträgt 0,575 Gy/min. Die Kontrollansätze blieben unbestrahlt. Während die Zellen auf den Objektträgern direkt im Anschluss an die Strahlenbehandlung im Comet-Assay gemäß dem harmonisierten Protokoll weiterverarbeitet wurden, wurden die für die Expressionsanalyse bestimmten Zellen bis zur RNA-Isolierung 6h bei 37°C inkubiert.

II.2.1.2. Comet-Assay

Für die Comet-Analysen wurde die genomische DNA der auf Objektträger in Agarose fixierten Zellen einer alkalischen Mikrogel-Elektrophorese unterworfen (Mayer et al. 2002). Dabei wurde das im Rahmen gegenseitiger Laborbesuche mit dem BfS harmonisierte Versuchsprotokoll angewendet. Das bei der Gelelektrophorese entstehende Wanderungsmuster der DNA wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer automatischen Auswertanlage (Fa. Metasystems, Altlußheim). Indem man den Zellen im Anschluss an die Bestrahlung erlaubte, für eine bestimmte Zeit (15 bzw. 60 min) die induzierten Schäden zu reparieren, wurde zusätzlich die Fähigkeit der Zellen, induzierte DNA Schäden in einer bestimmten Zeit zu reparieren ermittelt.

Diese DNA-Reparaturkapazität (DRC) wurde nach der folgenden Formel ermittelt:

$$DRC_{xmin} = 1 - \frac{TM_{xmin} - TM_{DNA-Hintergrundschädigung}}{TM_{0min} - TM_{DNA-Hintergrundschädigung}} \times 100$$

Die experimentellen Untersuchungen mit dem Comet-Assay konnten für alle 75 Proben erfolgreich durchgeführt und ausgewertet werden. Die entsprechenden Rohdaten wurden bei der in Heidelberg durchgeführten Labor-Auswertung mit Hilfe des jeweils mitgeführten internen Standards normalisiert. Hierzu wurde für jeden Parameter der Mittelwert aus den 15 Wiederholungen des internen Standards berechnet und für jeden Versuchstag der davon abweichende Faktor ermittelt. Die Messwerte wurden dann jeweils um diesen Faktor korrigiert. Die 15-fache Wiederholung dieses internen Standards ist in Abb. II.2.1 dargestellt. Für den induzierten Schaden durch die Bestrahlung mit 5Gy ergab sich ein mittleres Tail Moment (TM) von 5.6 mit einem Variationskoeffizient von 21%.

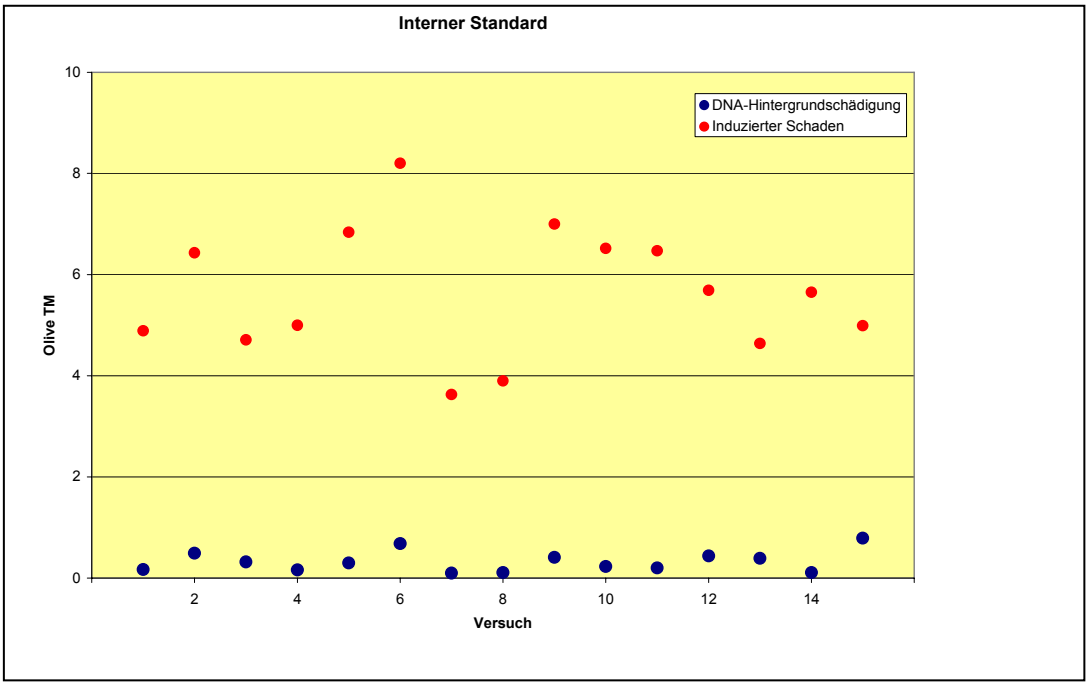


Abb.II.2.1: Comet-Assay: Interner Standard
15fache Wiederholung der bei jedem Comet-Assay-Experiment mitgeführten internen Standard-Kontrolle: Olive-Tailmoment (TM)-Werte für DNA Hintergrundschädigung und induzierten DNA-Schaden nach Bestrahlung mit 5Gy.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus primären Lymphozyten und Zelllinien zeigt deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellsystemen. Die Zelllinien weisen mit einem mittleren Tail Moment von 0.2 eine höhere DNA-Hintergrundschädigung, d.h. bereits vor der Bestrahlung vorhandene DNA-Schädigung, auf als die primären Lymphozyten (TM = 0.13, s. Abb. II.2.2). Die Zelllinien reagieren auf die Bestrahlung mit 5 Gy empfindlicher (TM = 5.4 vs 4.8, Abb.II.2.3), d.h. mit einer höheren Schadensinduktion als die primären Lymphozyten. Nach 15min haben die Zelllinien mit einer DNA-Reparaturkapazität von

83% im Vergleich zu den primären Zellen (DRC_{15min} = 60%) jedoch einen größeren Teil der Schäden repariert (Abb.II.2.4).

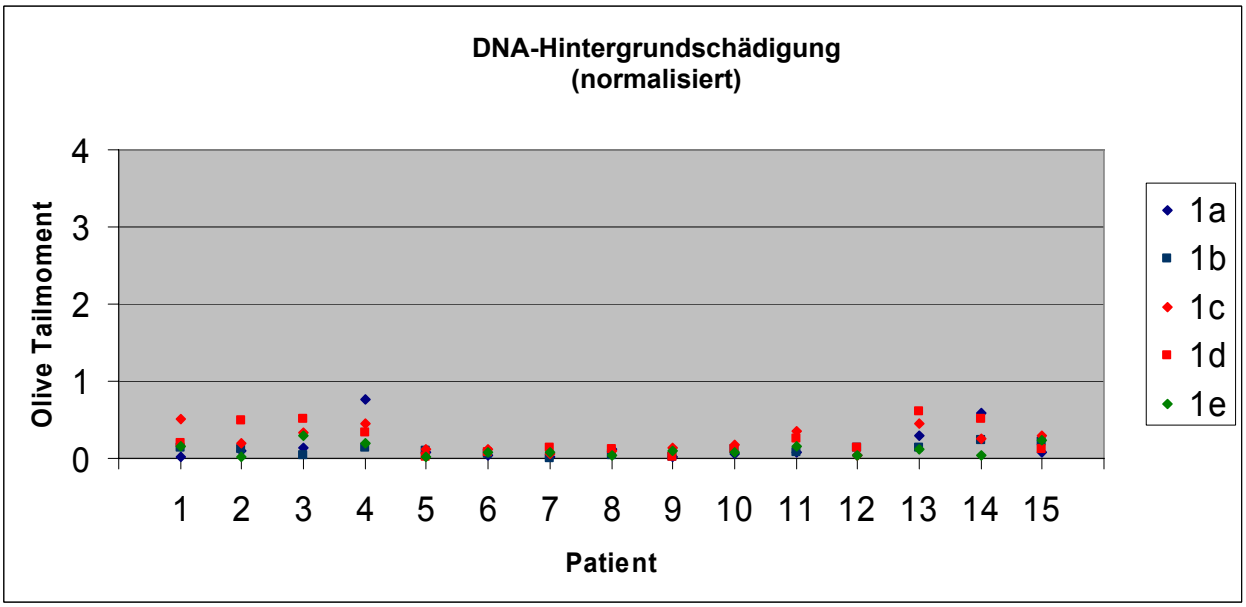


Abb. II.2.2.: Comet-Assay: DNA-Hintergrundschädigung
Vor der Strahlenbehandlung mit dem Comet-Assay messbare DNA-Grundschädigung in primären Lymphozyten (a,b), daraus generierten Zelllinien (c,d) und Kontrollzellen (e). Die Olive Tailmoment-Werte wurden anhand des mitgeführten internen Standards normalisiert.

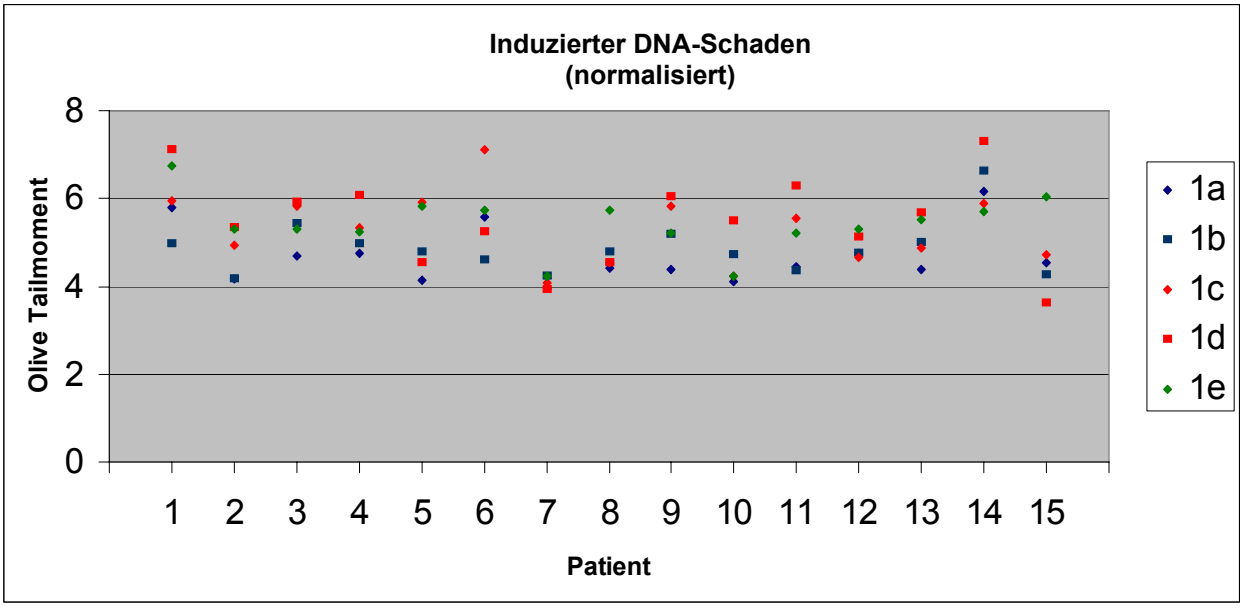


Abb. II.2.3: Comet-Assay: Induzierter DNA-Schaden
Durch Bestrahlung mit 5Gy induzierte DNA-Schäden in primären Lymphozyten (a,b), daraus generierten Zelllinien (c,d) und Kontrollzellen (e). Die Olive Tailmoment-Werte wurden anhand des mitgeführten internen Standards normalisiert. Die Zelllinien reagieren auf die Bestrahlung mit einer höheren Schadensinduktion als die primären Lymphozyten.

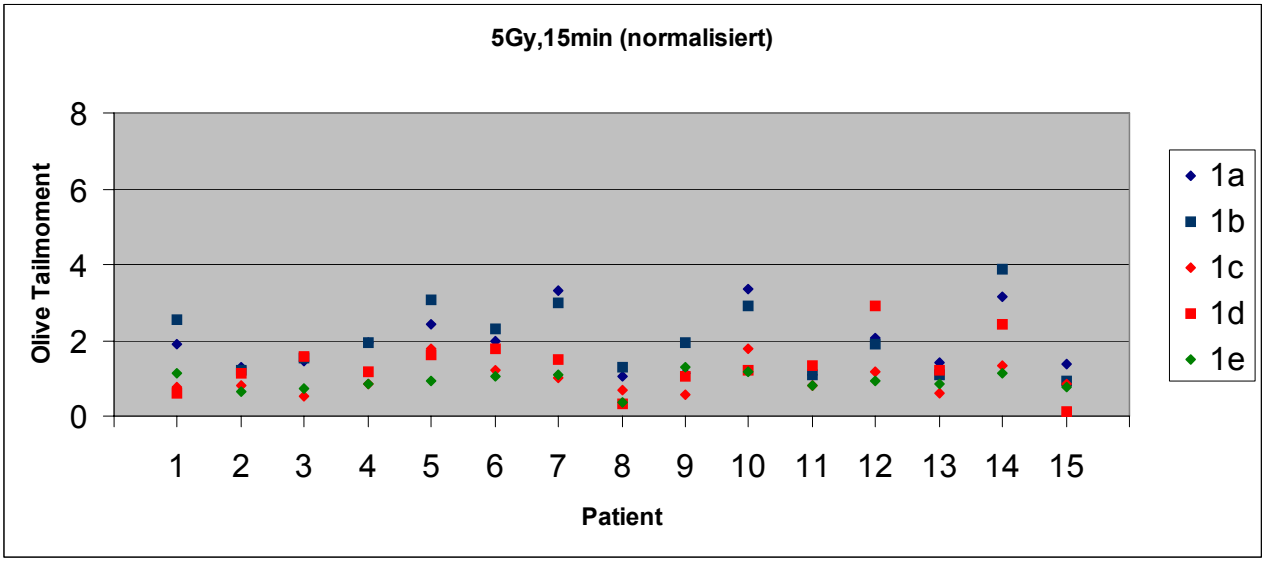


Abb. II.2.4: Comet-Assay: DNA-Reparatur 15min nach Bestrahlung
Nach einer Reparaturzeit von 15min nach Strahlenbehandlung noch messbare DNA-Schäden in primären Lymphozyten (a,b), daraus generierten Zelllinien (c,d) und Kontrollzellen (e). Die Olive Tailmoment-Werte wurden anhand des mitgeführten internen Standards normalisiert. Die Zelllinien haben im Vergleich zu den primären Lymphozyten nach 15 min einen größeren Teil der DNA-Schäden bereits wieder repariert.

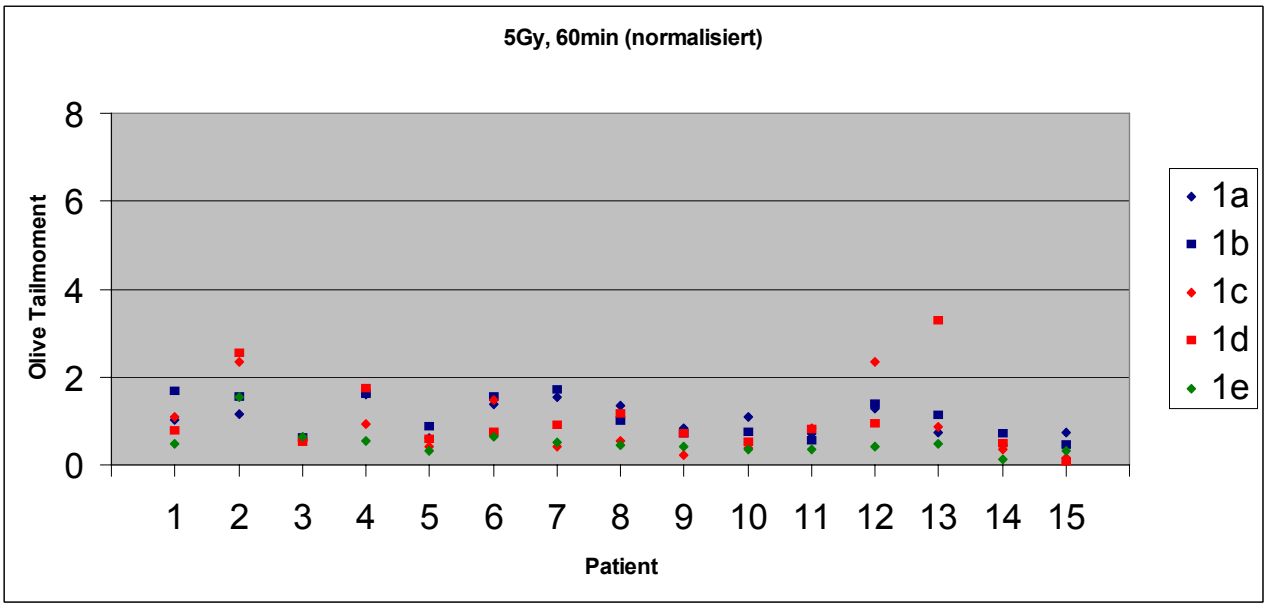


Abb. II.2.5: Comet-Assay: DNA-Reparatur 60min nach Bestrahlung
Nach einer Reparaturzeit von 60min nach Strahlenbehandlung noch messbare DNA-Schäden in primären Lymphozyten (a,b), daraus generierten Zelllinien (c,d) und Kontrollzellen (e). Die Olive Tailmoment-Werte wurden anhand des mitgeführten internen Standards normalisiert. Primäre Lymphozyten und Zelllinien haben vergleichbar die induzierten DNA-Schäden größtenteils wieder repariert.

Die statistische Auswertung hinsichtlich der Korrelation der gemessenen Daten mit der Patientenempfindlichkeit erfolgte durch das Institut für Medizinische Informatik IMIB in Münster. Hierzu wurde anhand der 15 Messwerte der internen Standardkontrolle zunächst die Standardnormalverteilung berechnet und Werte, die außerhalb des 95%

Referenzbereiches liegen als Ausreißer definiert. Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen (interner Standard, strahlenempfindliche und strahlenunempfindliche Patienten) auf einheitlichem Niveau wurde eine Transformation in eine standardisierte z-Variable durchgeführt, wodurch die Messwerte so verschoben wurden, dass sie in allen Gruppen den gleichen Mittelwert haben. Die Auswertungen bezüglich der klinischen Strahlensensitivität ließen für keinen der 4 gemessenen Comet-Assay-Parameter weder in primären Lymphozyten noch in den Zelllinien signifikante Unterschiede zwischen den unempfindlichen und empfindlichen Probanden erkennen (Abb.II.2.6 – Abb.II.2.13).

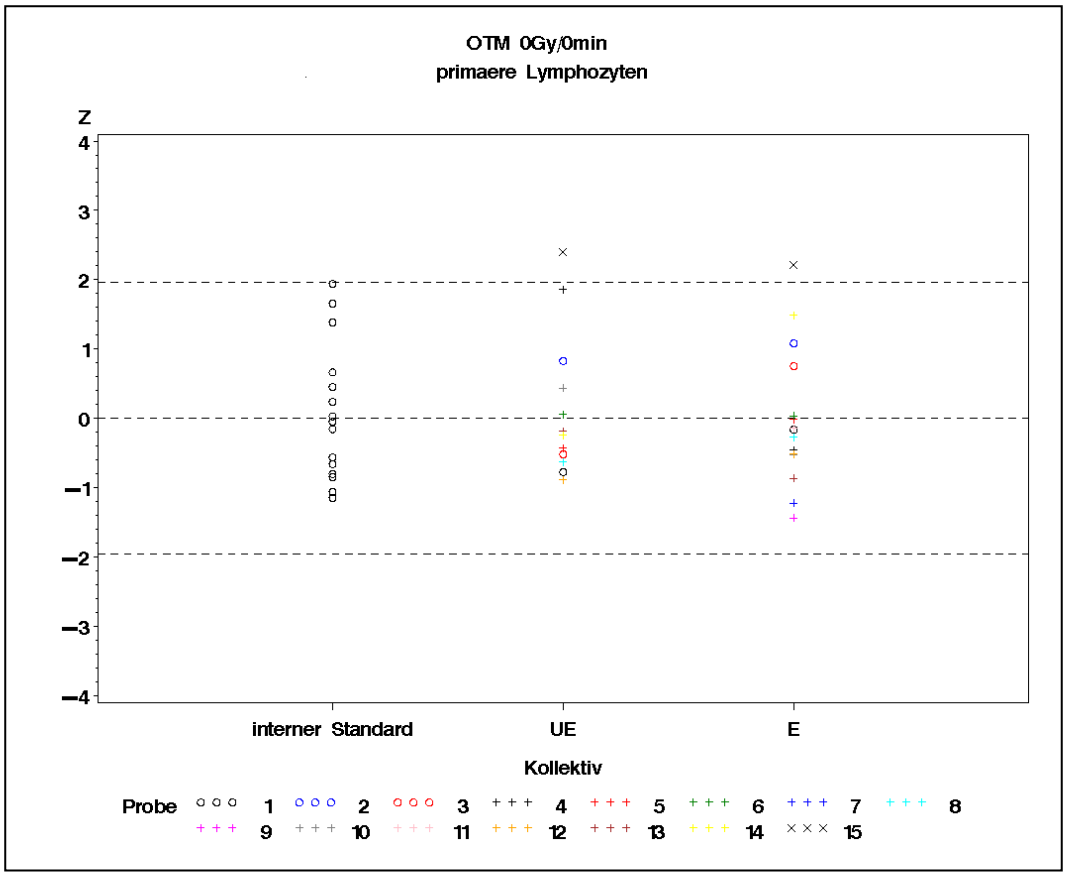


Abb. II.2.6.: Comet-Assay: DNA-Hintergrundschädigung in primären Zellen
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E) und strahlenunempfindliche Patienten (UE)

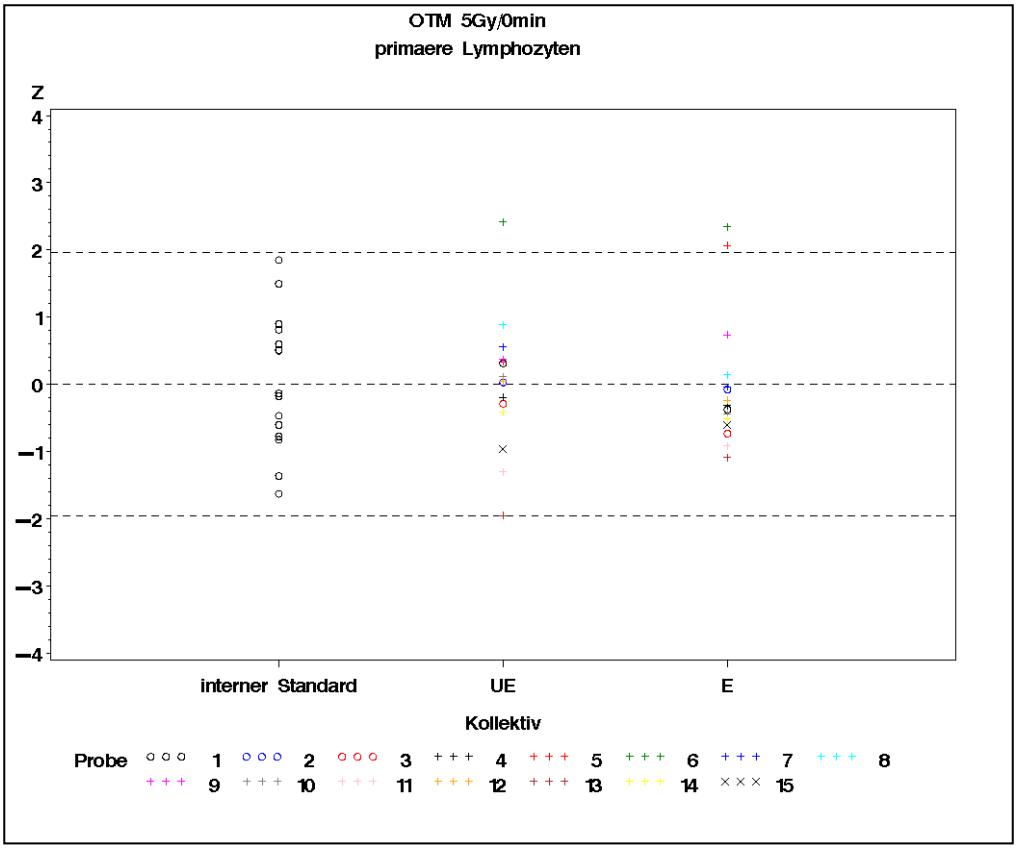


Abb. II.2.7.: Comet-Assay: Induzierter DNA-Schaden nach Bestrahlung mit 5 Gy in primären Zellen
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E) und strahlenunempfindliche Patienten (UE)

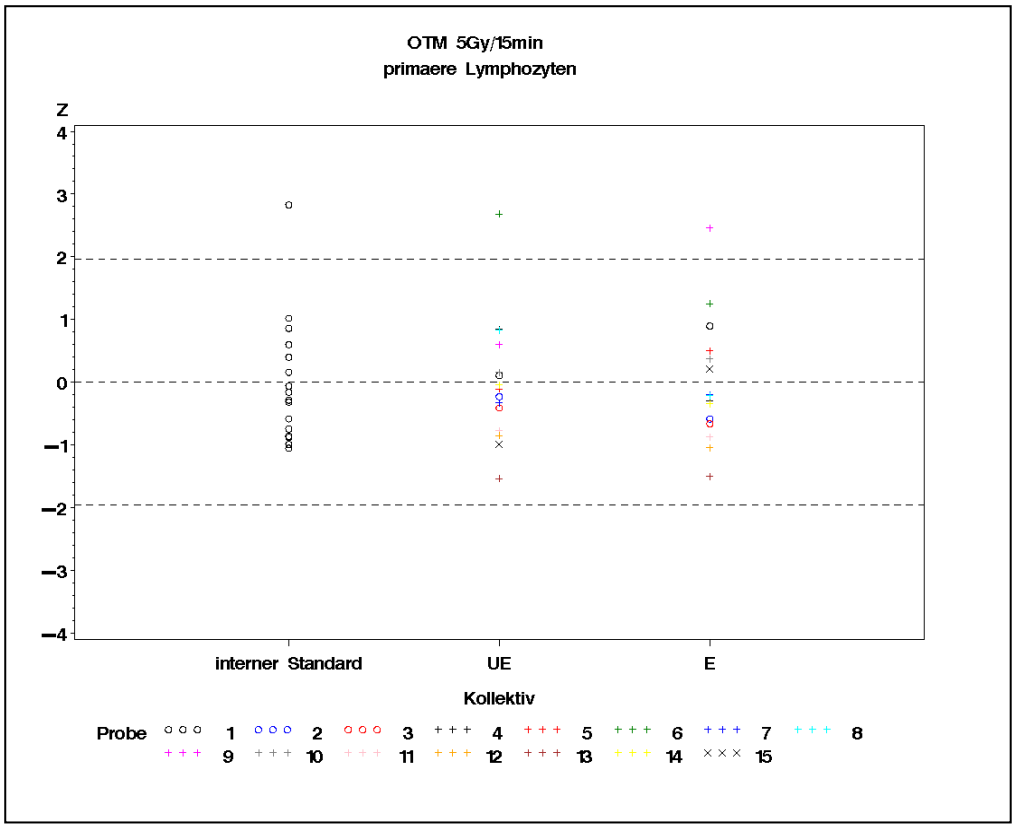


Abb. II.2.8.: Comet-Assay: DNA-Reparatur in primären Zellen 15min nach Bestrahlung
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E) und strahlenunempfindliche Patienten (UE)

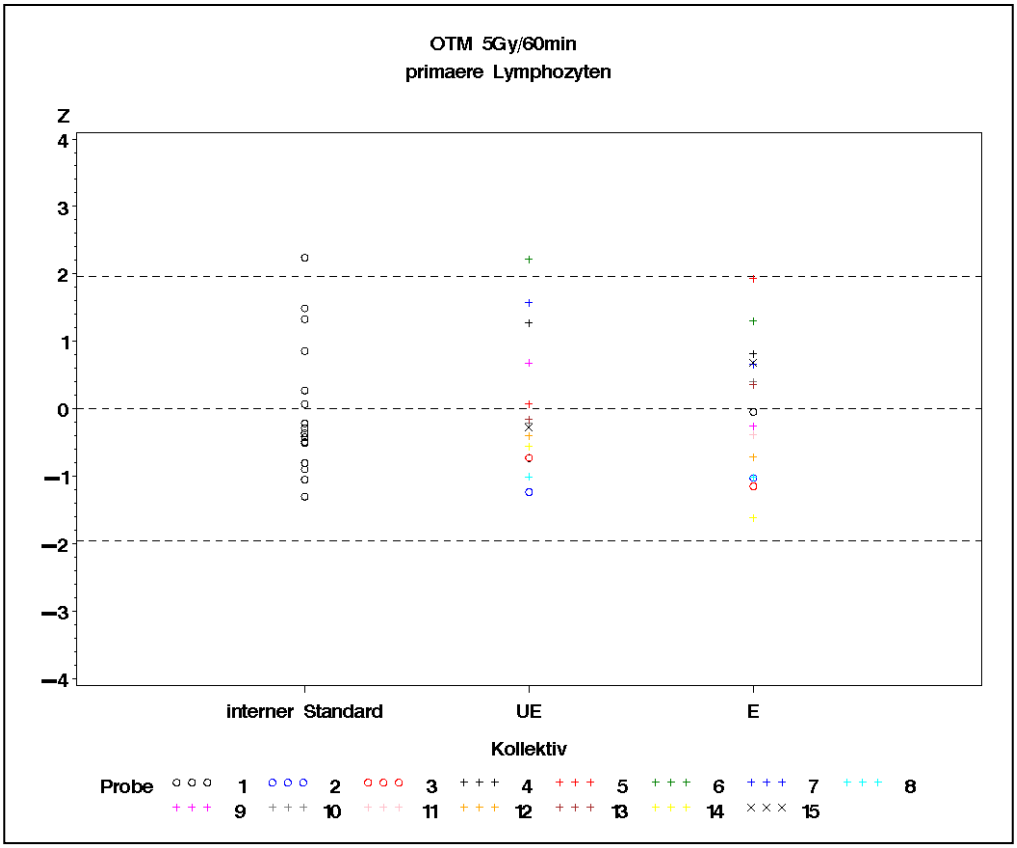


Abb.II.2.9.: Comet-Assay: DNA-Reparatur in primären Zellen 60min nach Bestrahlung
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E) und strahlenunempfindliche Patienten (UE)

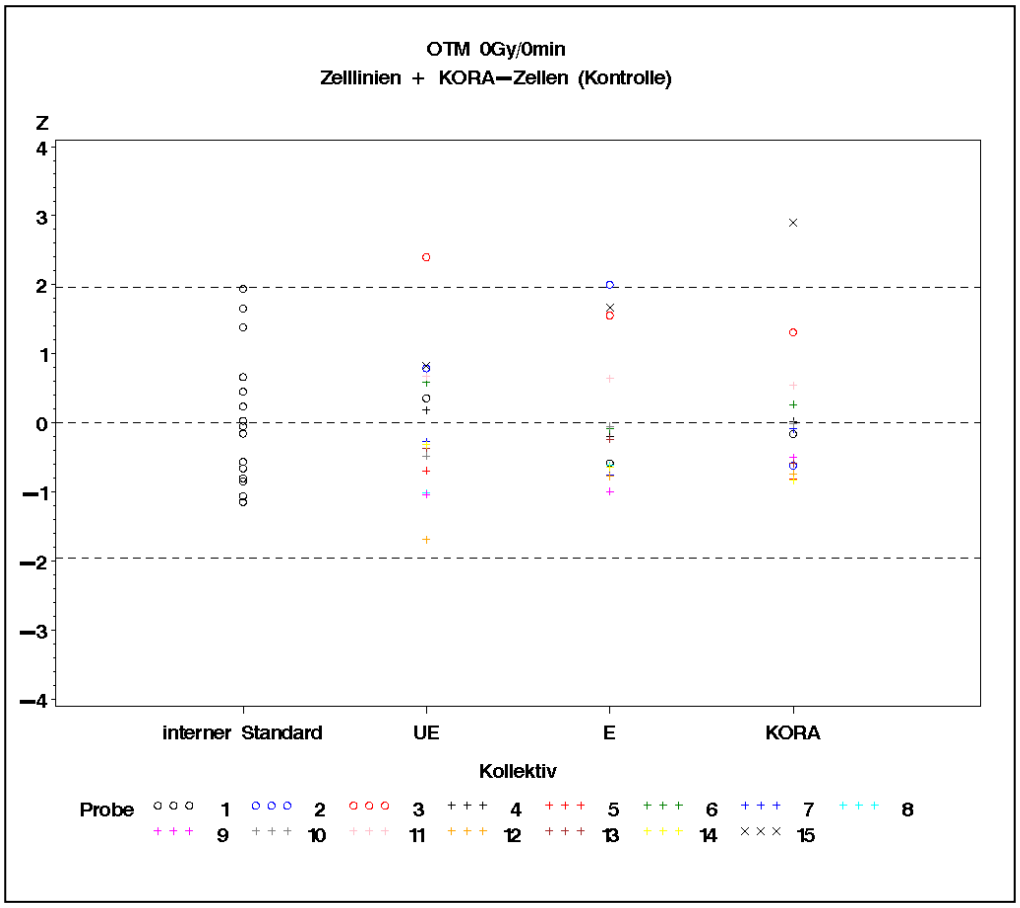


Abb. II.2.10: Comet-Assay: DNA-Hintergrundschädigung in Zelllinien
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E), strahlenunempfindliche Patienten (UE) und Kontrollzellen (KORA)

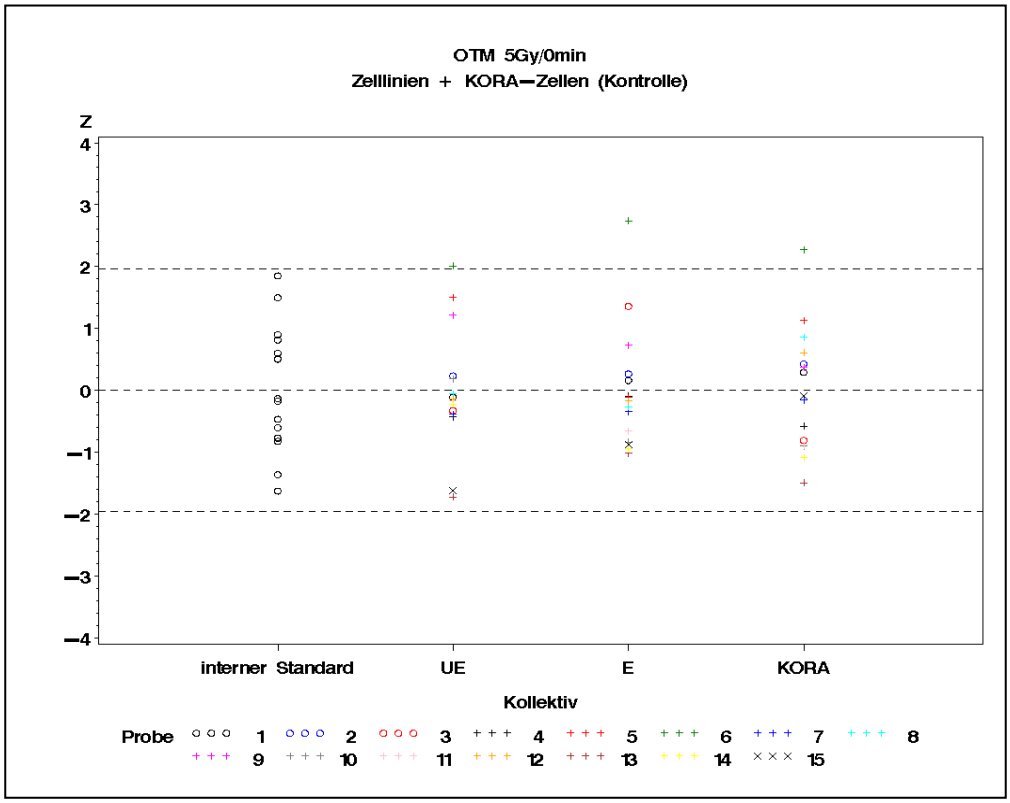


Abb. II.2.11: Comet-Assay: Induzierter DNA-Schaden nach Bestrahlung mit 5 Gy in Zelllinien
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E), strahlenunempfindliche Patienten (UE) und Kontrollzellen (KORA)

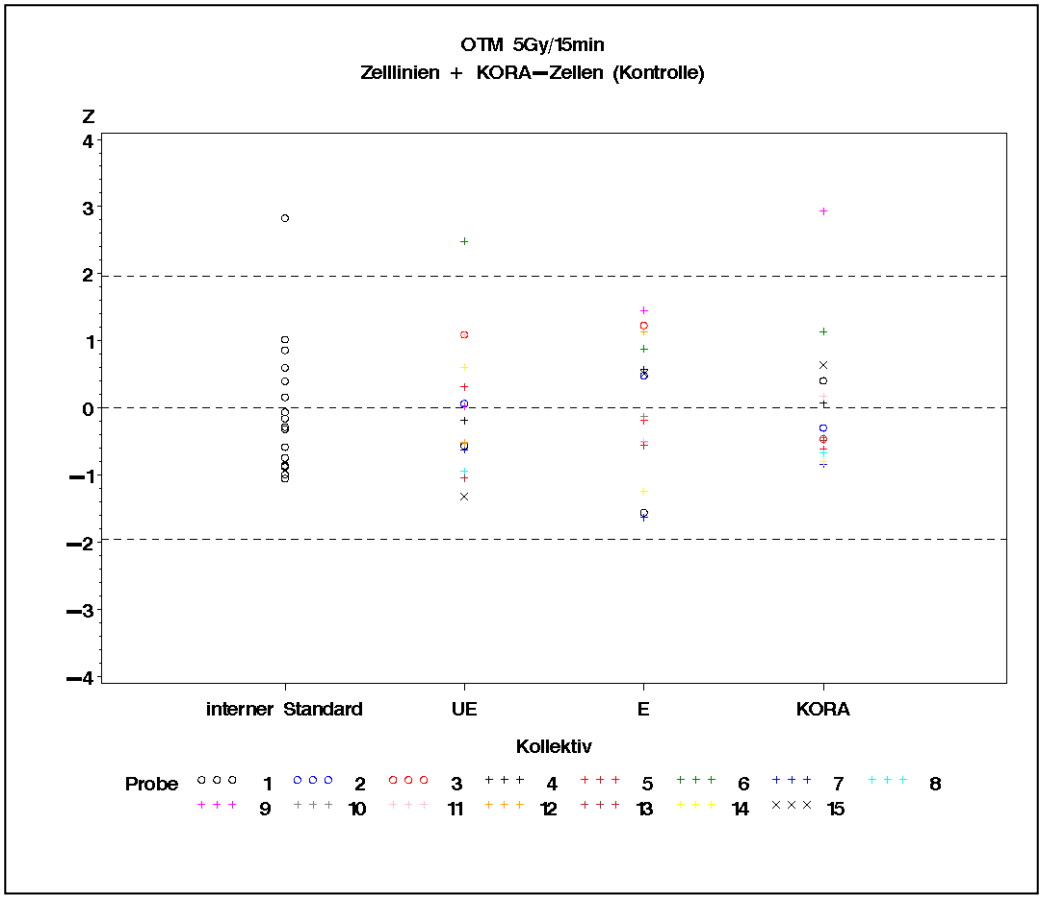


Abb. II.2.12: Comet-Assay: DNA-Reparatur in Zelllinien 15min nach Bestrahlung
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E), strahlenunempfindliche Patienten (UE) und Kontrollzellen (KORA)

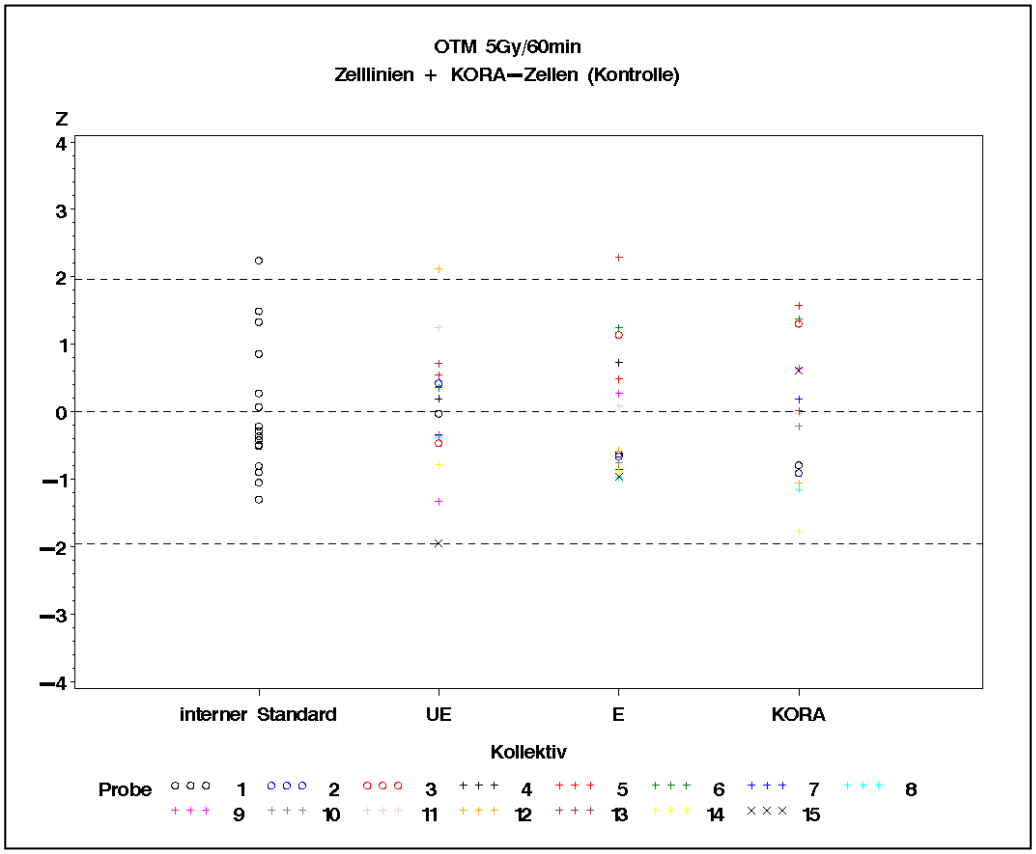


Abb. II.2.13: Comet-Assay: DNA-Reparatur in Zelllinien 15min nach Bestrahlung
Vergleich der zellulären Laborwerte mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit: interner Standard, strahlenempfindliche (E), strahlenunempfindliche Patienten (UE) und Kontrollzellen (KORA)

II.2.1.3. Genexpressionsuntersuchungen

6h nach der Strahlenbehandlung wurde die Gesamt-RNA sowohl der bestrahlten Zellen als auch der unbestrahlten Kontrollen durch Trizol-Extraktion isoliert. An einem Aliquot der gelösten RNA wurde durch Absorptionsmessung am Photometer sowohl die Konzentration (OD_{260}) als auch die Reinheit ($OD_{260/280}$) bestimmt. Während die Reinheit der Proben für primäre Lymphozyten und Zelllinien vergleichbar gut war, ergab die RNA-Isolierung aus den Zelllinien bei ähnlicher Ausgangs-Zellzahl eine etwa 10 mal höhere RNA-Ausbeute als aus den primären Lymphozyten. Die Integrität sämtlicher RNA-Proben wurde im Agilent-Bioanalyzer 2100 als Qualitätskontrolle des Ausgangsmaterials für die nachfolgende Expressionsanalyse überprüft und zeigt in über 90% der Proben ausreichende Qualität.
In Zusammenarbeit mit der zentralen Einheit für Genexpressionsanalysen des DKFZ Heidelberg wurden für die Proben mit der Beadchip-Sentrix-Technologie der Firma Illumina genomweite Genexpressions-Profile erstellt (Kuhn et al. 2004). Bei dieser Technik sind jeweils ca. 10^5 Kopien genspezifischer Oligonukleotide an Mikropartikel gebunden. Für jedes der etwa 23.000 beim Menschen bekannten Gene sind ca. 30 dieser „beads“ über den Chip verteilt. Diese Technologie führt im Vergleich zu anderen Expressionsanalyse-Systemen zu einer deutlich höheren Zuverlässigkeit der Genexpressionsbestimmung.
Für 12 der 15 Patientengruppen liegen die Expressionsdaten vollständig vor. Die Expressionsprofile der Patienten wurden mit Profilen aus 4 Zelllinien nicht erkrankter Patienten (KORA-Kontroll-Zelllinien) verglichen. Da sich hierbei keine Auffälligkeiten ergaben, wurde aus Kostengründen auf die Analyse der restlichen 11 Kontroll-Zelllinien verzichtet. Die Qualität des gesamten Datensatzes wurde durch verschiedene Kontrollen bezüglich Hintergrund, Signalrauschen, Hybridisierungserfolg sowie Stringenz geprüft. Es handelt sich dabei um ca. 70×10^6 Einzelwerte, die von der Biostatistikabteilung (A. Benner, DKFZ) in Zusammenarbeit mit der zentralen Einheit für Genexpressionsanalysen des DKFZ (B. Korn) mittels Spezialsoftware auf Signifikanzen überprüft wurden. Da für die Gruppen 3, 7 und 15 Einzelwerte fehlen, wurden diese Gruppen nicht in die vergleichende Analyse der Daten einbezogen.
Eine erste Auswertung wurde für die zunächst bzgl. Strahlenempfindlichkeit verblindeten Zell-Gruppen (primäre Lymphozyten bestrahlt/unbestrahlt, Zelllinien bestrahlt/unbestrahlt, Kontrollzellen (KORA), bestrahlt/unbestrahlt) durchgeführt. Eine deskriptive Untersuchung der Zell-Gruppen mit Hilfe einer hierarchischen Clusteranalyse zeigt im resultierenden

Dendrogramm, erkennbar durch die Länge der Äste zwischen zwei Gruppen von Beobachtungen, einen deutlichen Unterschied zwischen den primären Lymphozyten und Zelllinien. Die Kontrollzelllinien (KORA) unterscheiden sich geringfügig in ihrem Profil von den Zelllinien der Ringstudie. Die Bestrahlung der Proben mit 5Gy hat im Vergleich zu der Immortalisierung der Zellen durch EBV einen vergleichsweise geringen Einfluss auf das genomweite Expressionsprofil.

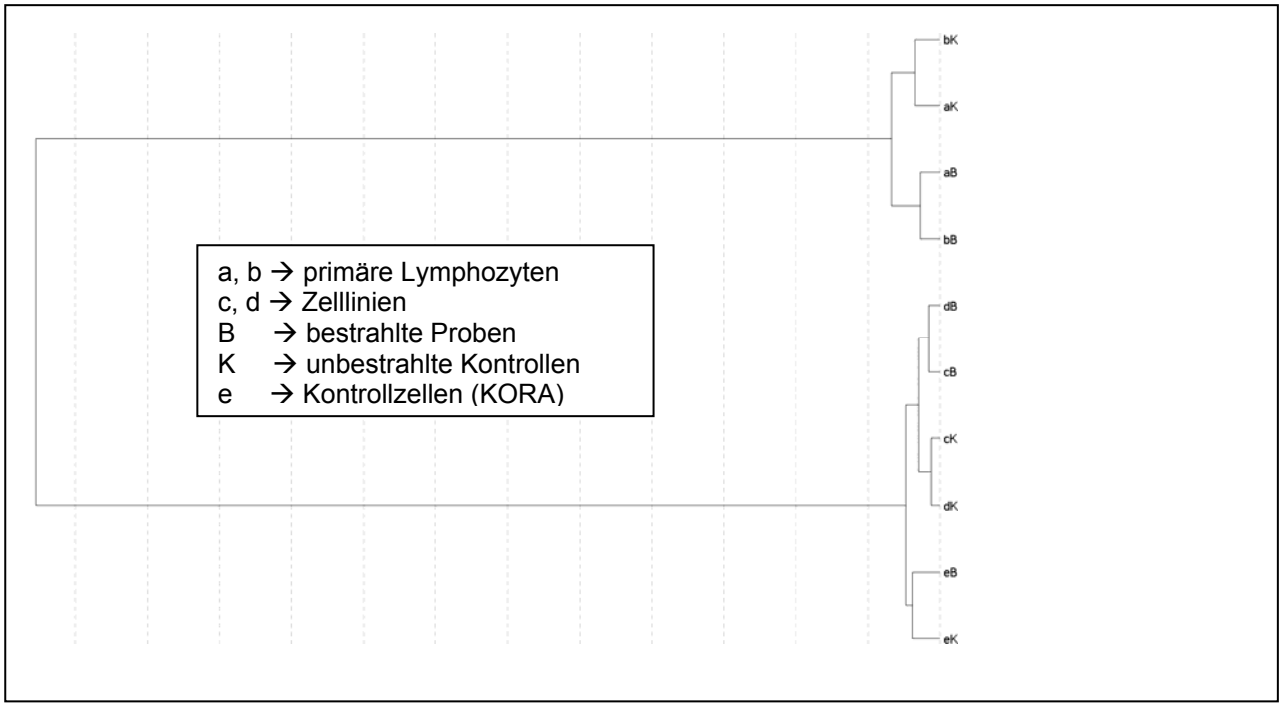


Abb. II.2.14: Genexpressions-Analyse: Dendrogramm der Cluster der verschiedenen Proben-Gruppen
Die Proben wurden nach Quantil-Normalisierung einer Clusteranalyse unterzogen unter Verwendung der medianen Expressionswerte aller auf dem Array vorhandenen Transkripte. Korrelationsclustering berechnet die Pearson Korrelation durch Verwendung des 1—r Distanz-Maßes, entsprechend folgender Gleichung:

$$r = \frac{1}{N}\sum i = 1, N\left(\frac{x_i - \bar{x}}{\sigma_x}\right)\left(\frac{y_i - \bar{y}}{\sigma_y}\right)$$

Zur Prüfung der Änderung der Genexpression unter Bestrahlung bzw. als Folge der Immortalisierung wurden genweise gepaarte t-Tests verwendet. Zur Kontrolle des multiplen Testens wurden permutations-adjustierte P-Werte gemäß der “step-down multiple testing procedure” von Westfall & Young (Westfall &Young, 1993) berechnet. Die verwendeten Tests basieren dabei auf standardisierten t-Teststatistiken für gepaarte Daten.

Gene wurden anschließend bzgl. ihrer Expression als auffällig selektiert, wenn der adjustierte P-Wert kleiner als 0.05 war und der geschätzte Fold Change (FC) größer als 1.5 bzw. kleiner als 0.67 war.

Die Bestrahlung der Zellen mit 5Gy führte in der Gruppe der primären Lymphozyten bei 153 Genen zur differentiellen Regulation, in den Zelllinien waren 123 Gene mindestens um den Faktor 1.5 nach oben oder unten reguliert (S. Tabelle II.1 und Tabelle im Anhang S. 120). Ca. ¼ dieser Gene (n=29) sind in beiden Gruppen identisch. Der „Fold Change“, d.h. die strahleninduzierten Expressionsunterschiede sind dabei für die meisten dieser Gene in den primären Lymphozyten höher als in den Zelllinien.

Während die Bestrahlung der Zellen auf das Gesamt-Expressionprofil eine vergleichsweise geringe Auswirkung hatte, führte die Immortalisierung der primären Lymphozyten durch EBV-Transformation zu einer drastischen Veränderung der Transkriptionsprofile. In den unbestrahlten Kontrollen unterscheiden sich 4813 Gene im Expressionsniveau in diesen beiden Gruppen mindestens um den Faktor 1.5, wobei etwa gleich viele Gene nach oben und nach unten reguliert werden.

Tabelle II.1: Durch Bestrahlung und EBV-Transformation regulierte Gene (adjustierter p-Wert < 0.05), Anzahl ausgewertete Gene: 22.177 ; Proben: n = 104, jeweils Paare von n = 12.

	Anzahl regulierter Gene* (↑, ↓)	**Fold change * (min - max)**	
Primäre Lymphozyten Bestrahlt vs unbestrahlte Kontrolle	**153 (90 / 63)**	0.26 – 12.29	**Regulation durch Bestrahlung**
EBV transformierte Zelllinien Bestrahlt vs unbestrahlte Kontrolle	**123 (85 / 38)**	0.42 – 3.35	
Unbestrahlte Kontrolle Primäre Lymphozyten vs Zelllinien	**4813 (2583 / 2230)**	0.005 - 55.77	**Regulation durch Immortalisierung**
Bestrahlte Zellen Primäre Lymphozyten vs Zelllinien	**4344 (2319 / 2025)**	0.006 - 48.87	

* Cut-Off 1.5 bzw. 0.67,

Eine hierarchische Clusteranalyse zur Suche nach Patientengruppen mit ähnlichem Genexpressionsprofil auf Einzel-Patienten-Ebene ohne Berücksichtigung der paarweisen Abhängigkeiten zeigt anhand des resultierenden Dendrogramms sehr deutlich, dass die Profile sehr spezifisch für das jeweilige Individuum sind. Es zeigt sich, dass die Unterschiede im Expressionsprofil vor und nach der Bestrahlung der Zellen eines Patienten wesentlich geringer sind als die Unterschiede zwischen den Patienten. D.h. in den meisten Fällen findet sich die bestrahlte Probe eines Patienten im Dendrogramm unmittelbar neben der zugehörigen unbestrahlten Kontroll-Probe wieder. (s.Abb.II.2.15).

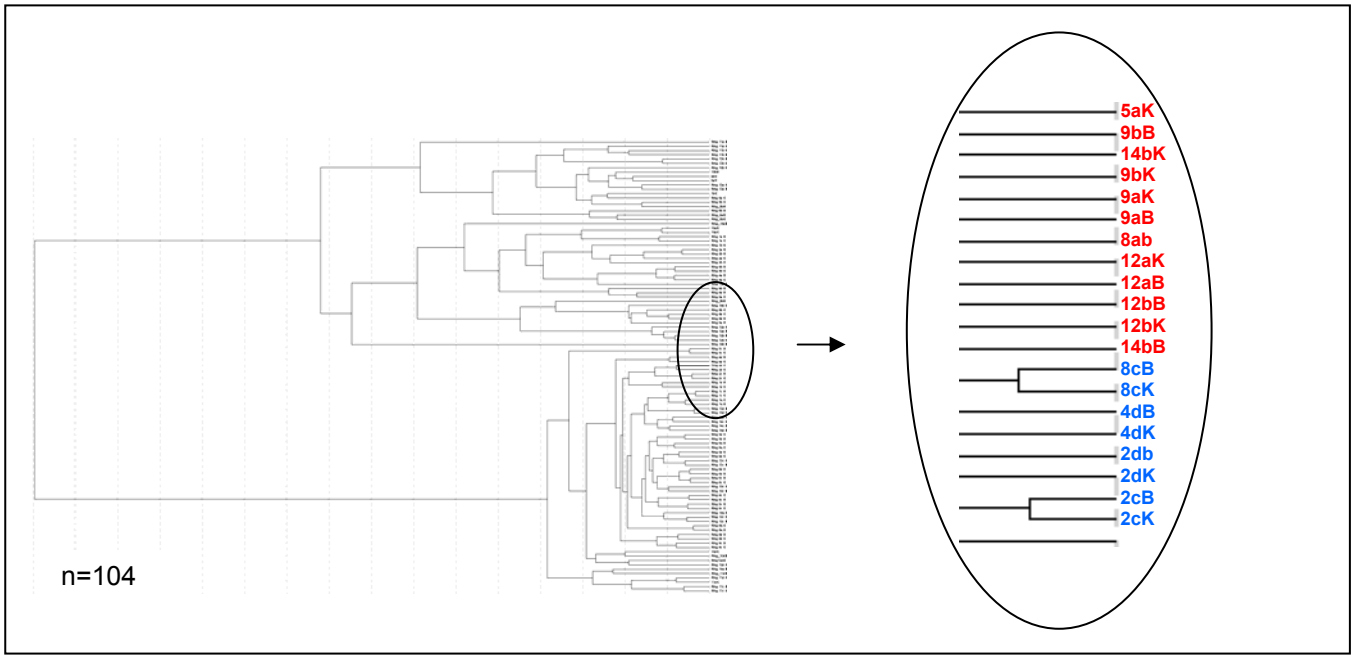


Abb. II.2.15: Genexpressions-Analyse: Dendrogramm der einzelnen Proben
Die Clusteranalyse zeigt deutliche Unterschiede in den Expressionsprofilen der **primären Lymphozyten** (x**a**,x**b**) und der daraus generierten **Zelllinien** (x**c**, x**d**). Die Profile zeigen hohe Spezifität für den jeweiligen Patienten: Bestrahlte Probe (xx**B**) und unbestrahlte Kontrolle (xx**K**) des gleichen Patienten finden sich im Dendrogramm in den meisten Fällen direkt nebeneinander wieder.

Bei der Betrachtung der strahleninduzierten Expressionsunterschiede auf dem Niveau der einzelnen Patienten fällt auf, dass für viele Gene sowohl die Stärke der Induktion als auch die interindividuellen Unterschiede in der Strahlenreaktion bei den primären Lymphozyten deutlich höher sind als bei den Zelllinien. Dies ist beispielhaft für das Gen PCNA in Abb. II.2.16 gezeigt. Die primären Lymphozyten scheinen für diesen Endpunkt deutlich empfindlicher zu sein als die daraus hervorgegangenen transformierten Zelllinien.

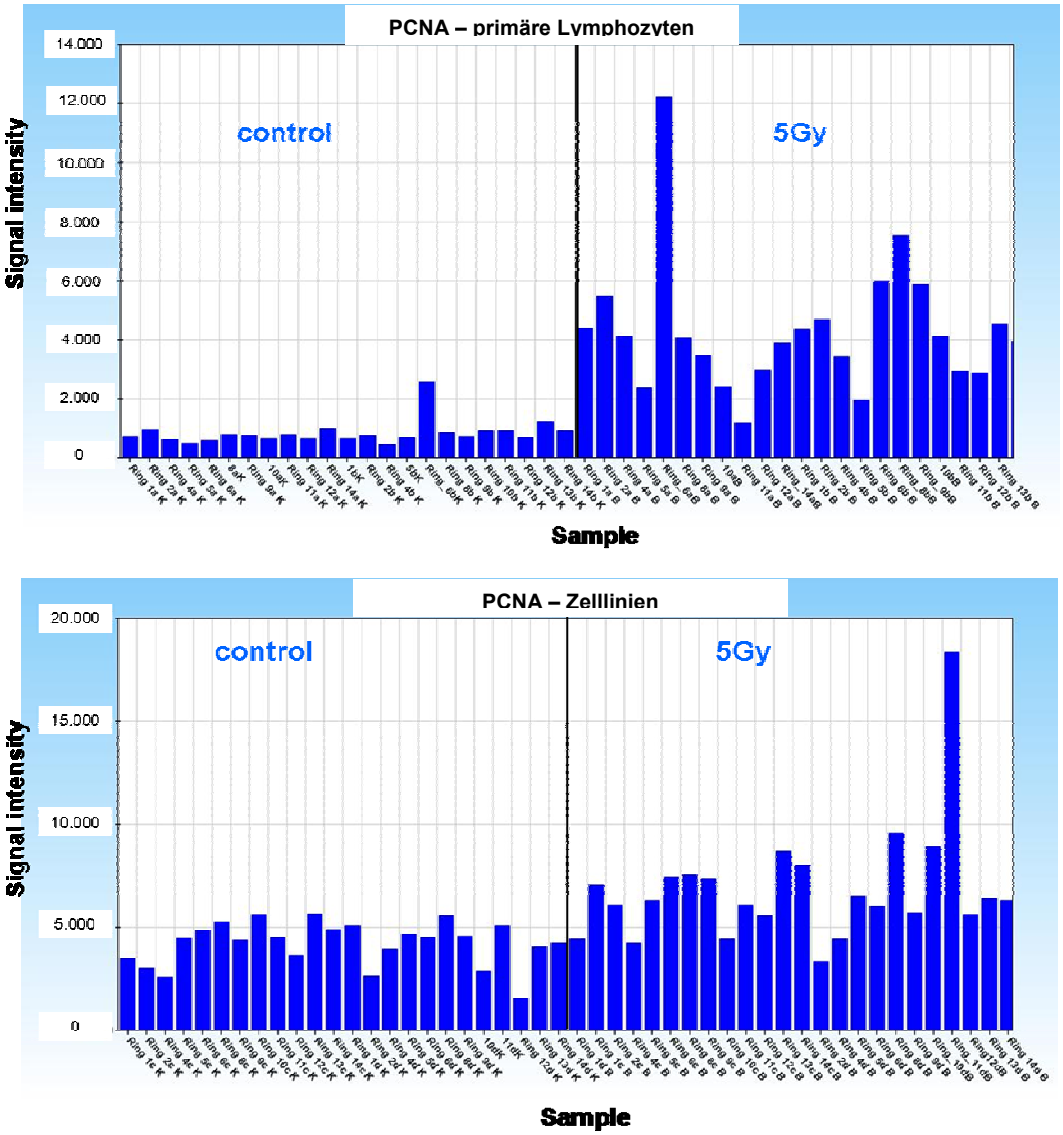


Abb. II.2.16: Expressionswerte für die einzelnen Zellproben in primären Lymphozyten und Zelllinien am Beispiel des Gens PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) in bestrahlten Zellen und unbestrahlten Kontrollen. Die strahleninduzierte Genregulation sowie die interindividuelle Variabilität sind in primären Lymphozyten deutlich größer als in den jeweils zugehörigen Zelllinien.

Um von der Bestrahlung und der Immortalisierung betroffene Stoffwechsel-Wege und funktionelle Netzwerke identifizieren zu können, wurden die umfangreichen Daten unter Verwendung einer speziellen Pathway-Analyse-Software (Ingenuity IPA) näher untersucht. Abb. II.2.17 zeigt die in primären Lymphozyten durch die Bestrahlung am stärksten betroffenen zellulären Pathways. Es handelt sich hierbei vor allem um Gene, die im „p53 signalling“, in der Zellzykluskontrolle sowie in der Apoptose-Regulation eine Rolle spielen. Die Immortalisierung der primären Lymphozyten durch EBV führt zu veränderter Genexpression in Genen aus ca. 170 verschiedenen Pathways und damit zu sehr weitreichenden Veränderungen im Transkriptom der Zelle.

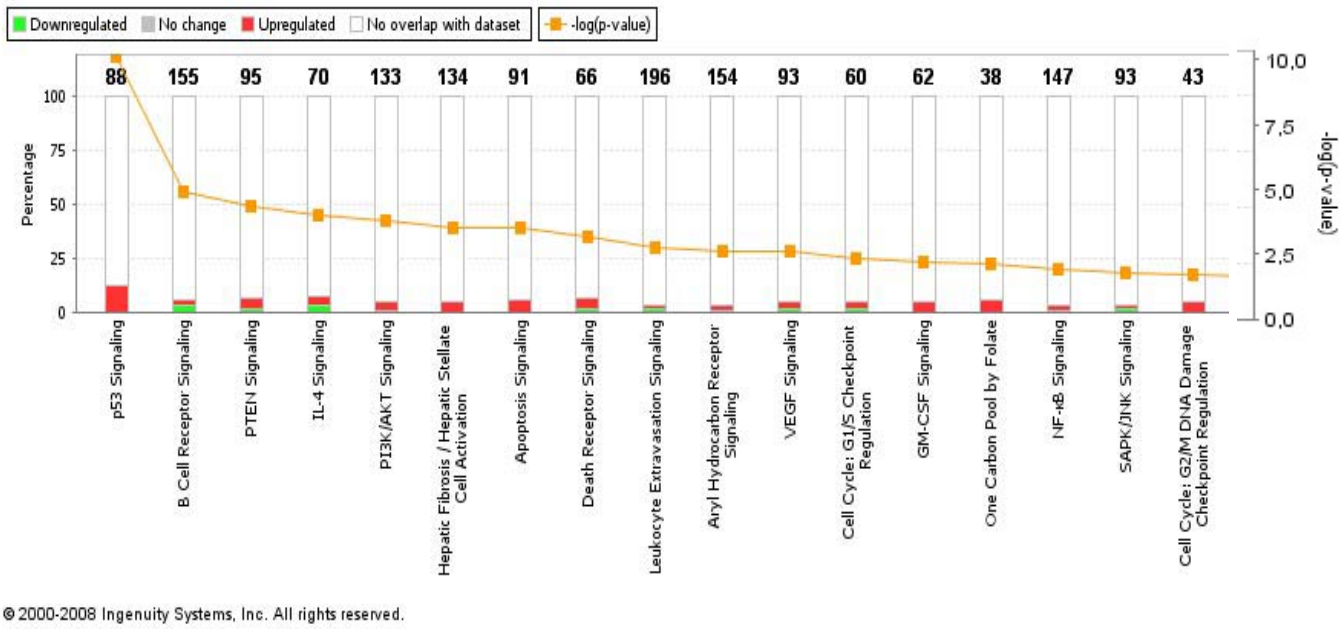


Abb. II.2.17 Pathway-Analyse der strahleninduzierten Genregulation in primäre Lymphozyten.
Die Signifikanz der Assoziation zwischen Datensatz und identifiziertem zellulärem Pathway ist dargestellt als (1) dem Anteil der regulierten Gene aus dem Datensatz an der Gesamtzahl der Gene in dem entsprechenden Pathway und (2) dem p-Wert (Fischer's exact test) zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Assoziation zwischen Datensatz und Pathway.

Nach Entblindung der Patientendaten erfolgte die Analyse der Genexpressionsdaten unter Berücksichtigung der Strahlenempfindlichkeit. Hierzu wurden für die primären Lymphozyten sowie für die Zelllinien jeweils lineare Regressionsmodelle verwendet, um den Effekt der Bestrahlung für strahlenempfindliche bzw. unempfindliche Patientenzellen zu prüfen. P-Werte wurden für „moderierte" t Statistiken unter Verwendung empirischer Bayes-Schätzung der residualen Standardabweichung berechnet (Smyth 2004). Resultierende P-Werte wurden bzgl. Multiplen Testens zur Kontrolle der *False-Discovery-Rate* (FDR) gemäß Benjamini & Yekutieli (2001) adjustiert. Alle Berechnungen wurden unter Verwendung des R Pakets limma durchgeführt.

Im untersuchten Patientenkollekiv findet sich kein Gen, das sich im konstitutiven Expressionsniveau in den beiden Patientengruppen „strahlenempfindlich" bzw. „unempfindlich" signifikant voneinander unterscheidet. D.h. signifikante Unterschiede in der Genexpression finden sich sowohl in primären Lymphozyten als auch in Zelllinien nur nach Bestrahlung der Zellen. Entsprechend wurden die statistischen Auswertungen getrennt nach Patientengruppen „strahlenempfindlich" bzw. „unempfindlich" durchgeführt, wobei als Signifikanzniveau dementsprechend α=2.5% gewählt wurde. Die Heatmap in Abb.II.2.18 zeigt die strahleninduzierten Veränderungen im Expressionsniveau der einzelnen Gene (Fold Changes, FC) auf Einzel-Patientenebene. Es sind die Daten für alle

Gene dargestellt, für die in den primären Lymphozyten die gewählten Selektionskriterien absoluter FC > 1.5 und adjustierter p-Wert <2.5% in mindestens einer der beiden Gruppen „klinisch strahlenempfindlich“ bzw. „unempfindlich“ erfüllt sind.

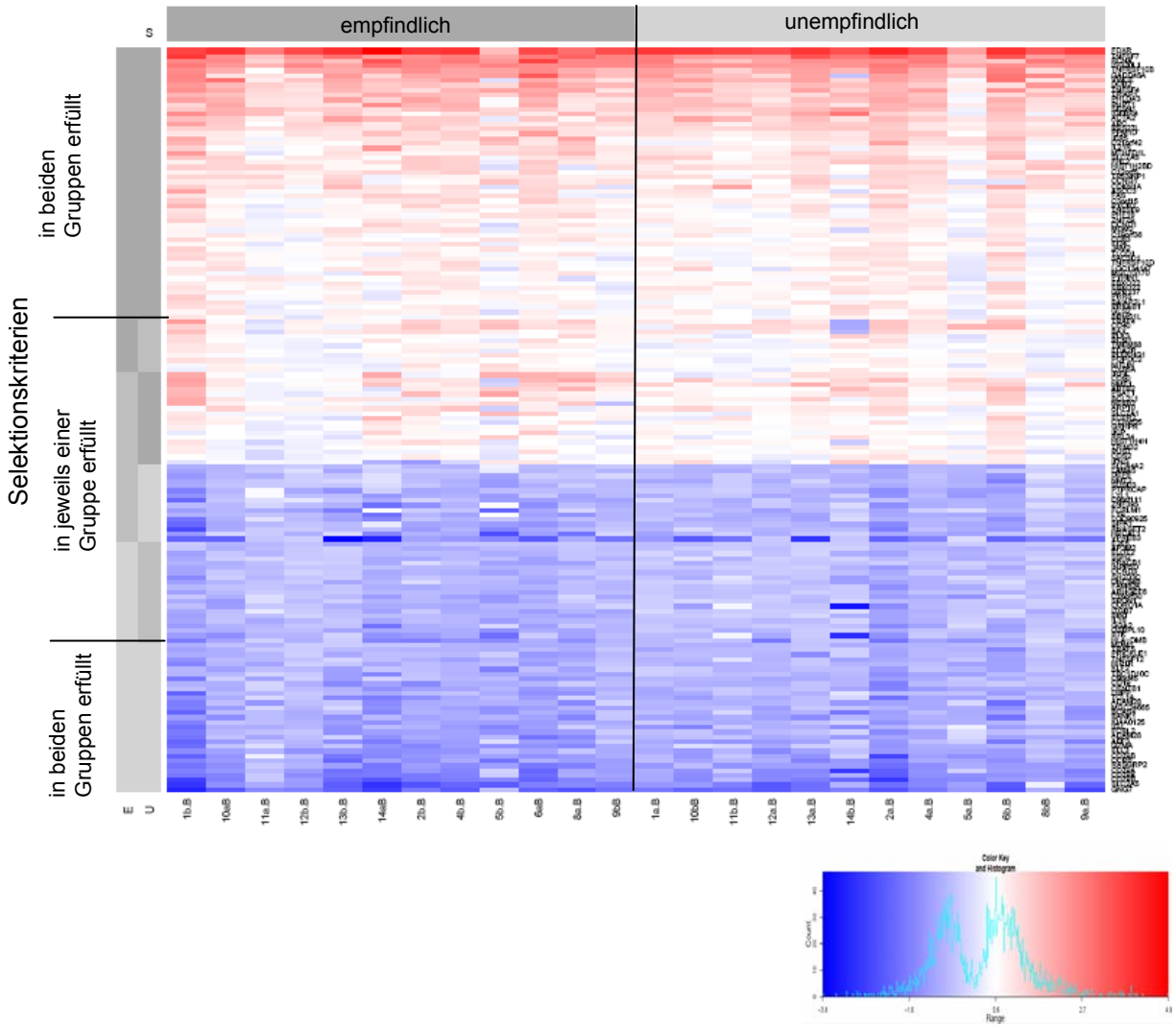


Abb. II.2.18 Expressionsprofile in primären Lymphozyten. Die Heat map stellt die log2 Fold changes der Genexpressionswerte (bestrahlte Probe/unbestrahlte Kontrolle) nach Bestrahlung der Zellen in strahlenempfindlichen und unempfindlichen Patienten dar. Erfasst sind alle Gene, für die in mindestens einer der beiden Patienten-Gruppen der Betrag des strahleninduzierten fold changes >1.5 ist bei einem adjustierten p-Wert < 0.025. Strahleninduzierte Hochregulation ist rot, verminderte Expression blau dargestellt, wobei die Farbintensität ein Maß für die Stärke der Regulation ist.

Von den 154 selektierten Genen, die gemäß der geforderten Kriterien bzgl. P-Wert und Fold Change durch die Bestrahlung „relevant“ reguliert werden, erfüllen 67 Gene die angelegten Kriterien für jeweils nur eine der beiden klinischen Gruppen und bilden somit einen Vorschlag für eine Auswahl an klassifizierenden, d.h. Gruppen-unterscheidenden Genen (s. Abb. II.2.19). 24 dieser Gene, d.h. 36% gehören funktionell zur Gruppe der Apoptose bzw. der Zell-Zyklus regulierenden Genen (in der Abb. unterstrichen). Es wird auch bei dieser statistischen Datenauswertung deutlich, dass sich die primären Lymphozyten in der Genexpression von den Zelllinien unterscheiden. In den Zelllinien finden sich weniger Gene (n= 33), die die Selektionskriterien nur für eine der beiden Gruppen erfüllen; keines dieser selektierten Gene stimmt mit dem in den primären Lymphozyten gefundenen Markerset überein.

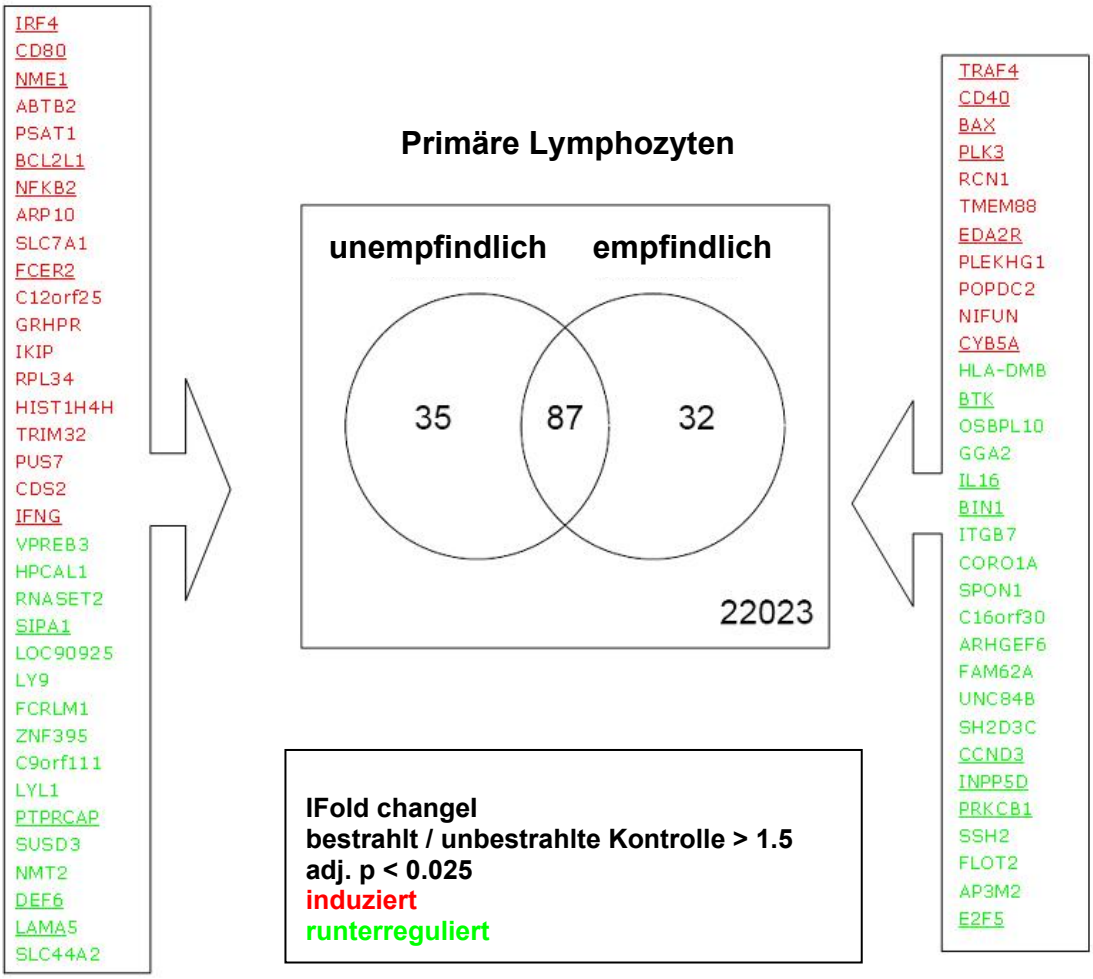


Abb. II.2.19 Klassifizierende Gene. 67 Gene klassifizieren strahlenempfindliche und unempfindliche Patienten, indem die gewählten Selektionskriterien für die strahleninduzierte Genregulation (Fold change und p-Wert) nur in einer der beiden Patientengruppen erfüllt sind. 87 Gene erfüllen die Kriterien gleichermaßen und sind daher für die Unterscheidung zwischen den beiden klinischen Ausprägungen nicht informativ.

Da es sich bei den beobachteten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen „strahlenempfindlich“ und „unempfindlich“ um relativ niedrige Abweichungen im durch die Bestrahlung induzierten Fold Change handelt, wurde eine zusätzliche Untersuchung durchgeführt. Die dieser Untersuchung zugrunde liegende Idee ist, dass auch geringfügige Genexpressionsänderungen in mehreren Genen eines bestimmten Stoffwechselweges für die Zelle zu ähnlichen oder sogar weitreichenderen Folgen führen können als die starke Regulation eines einzelnen Gens (Subramanian et al. 2005). Das Prinzip dieser Auswertung besteht darin, bestimmte zelluläre Prozesse und damit ausgewählte Gen-Subgruppen separat zu analysieren. Neben einer Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) bieten sich hierfür vor allem sogenannte globale Tests an (Goeman & Buehlmann 2007). Für die hier vorliegenden Fragestellungen wird ein globaler Test auf der Grundlage einer Varianzanalyse bzgl. des Bestrahlungseffekts in Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit berechnet (globaler ANOVA Test; Mansmann & Meister 2005).

Wir haben für die globale ANOVA Analyse Gensets aus relevanten „Pathways“ zu „Apoptosis“, „Damage Response“, „Cell Cycle“ und „DNA Repair“ aus einer speziell für solche Analysen erstellten Datenbank ausgesucht (Molecular Signature Database, MSigDB; www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/index.jsp). Die Gene aus den Genlisten zu Apoptose, Damage Response, Cell Cycle und DNA Repair zeigen dabei eine signifikante angereicherte strahleninduzierte Genregulation. Innerhalb dieser Genlisten haben die einzelnen Gene einen unterschiedlich großen Beitrag an dieser Anreicherung. Die Gene, die den größten Beitrag leisten, bewertet über einen mindestens einprozentigen Anteil an der Reduktion der Fehlerquadratsumme (Reduction in Sums of Squares > 1%) wurden getrennt für strahlenempfindliche und unempfindliche Patienten analysiert. Im Satz der „Apoptosis“- und „Cell Cycle“-Gene (Abb.II.2.20) fällt auf, dass für die Gene, für die sich dieser Beitrag in den beiden Patientengruppen unterscheidet, der relative Beitrag des jeweiligen Gens an der Strahlenantwort des gesamten „Pathways“ in den unempfindlichen Patienten höher ist als in den empfindlichen Patienten. Dieser Unterschied wird nur in den primären Zellen deutlich, nicht jedoch in den Zelllinien. D.h. wir haben mit dieser Art der Datenanalyse einen Satz an Genen identifiziert, für den der Beitrag an der strahleninduzierten Genregulation in den zellulären Funktionen Apoptose und Zellzyklus-Regulation in primären Lymphozyten strahlenempfindlicher Patienten reduziert und damit möglicherweise die gesamte Funktion in der Zelle beeinträchtigt ist.

Der mit den beschriebenen Methoden herausgearbeitete Satz an Markergenen muß jetzt in einem unabhängigen größeren Patientenkollektiv validiert werden.

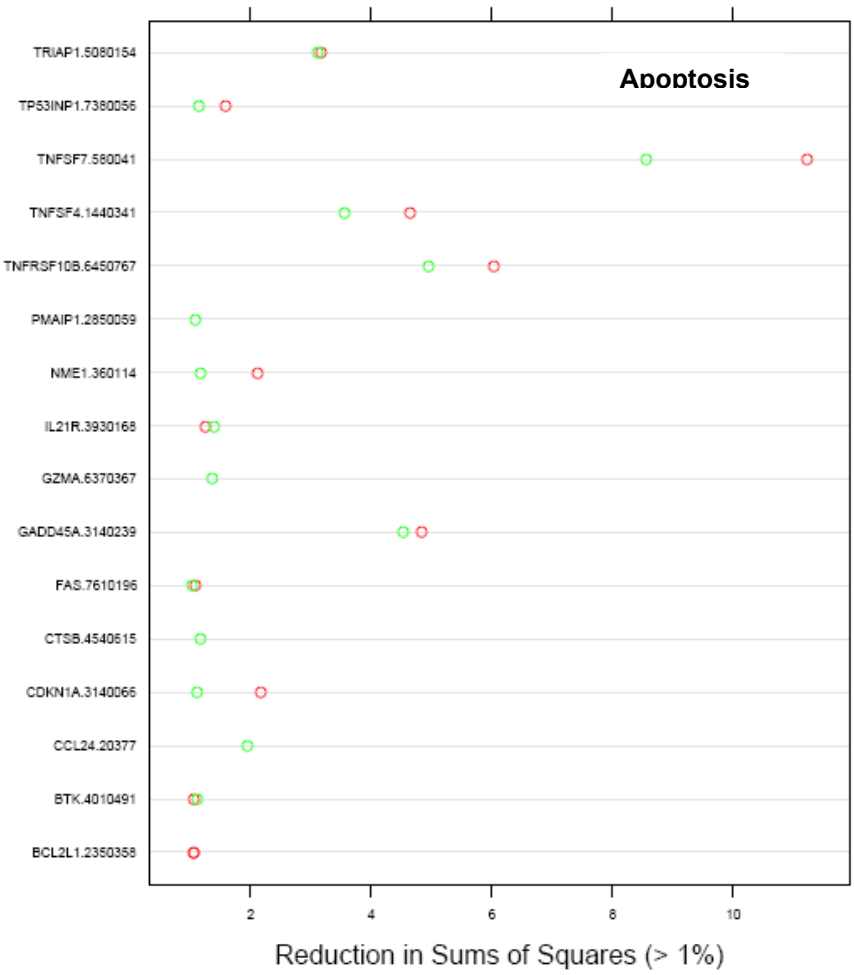
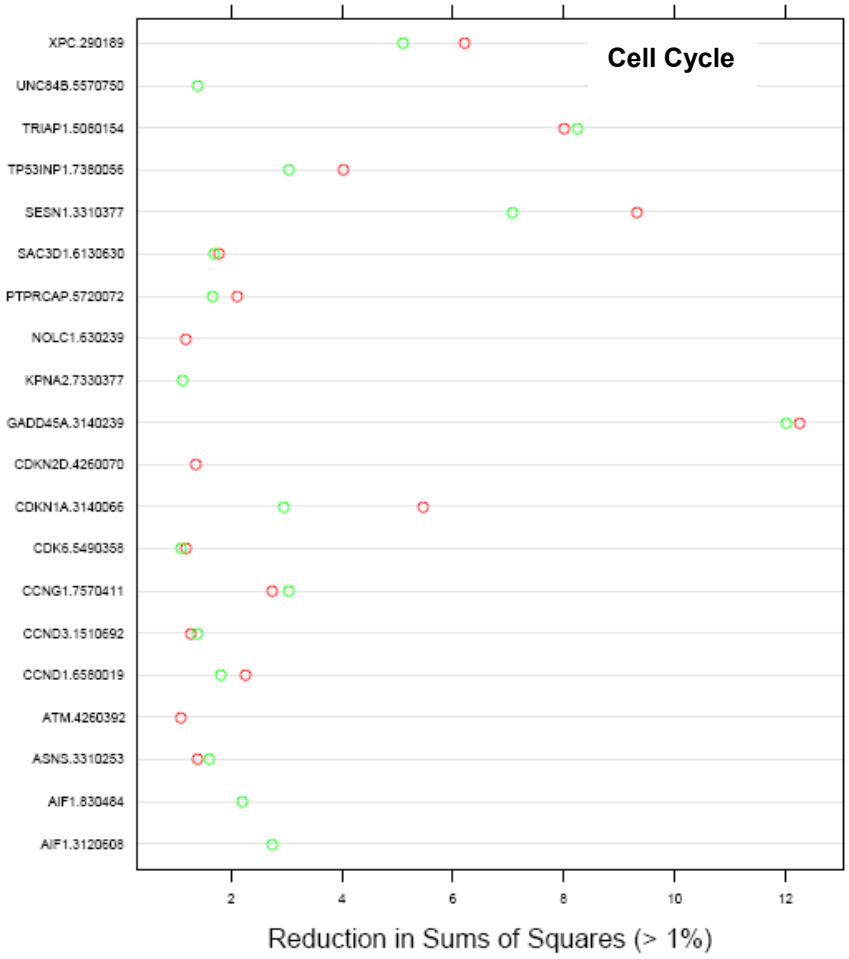


Abb. II.2.20: Globaler Anova-Test. Berechnung auf Grundlage einer Varianzanalyse bzgl. des Bestrahlungseffekts in Abhängigkeit der klinischen Strahlenempfindlichkeit. Für die Analyse wurden Listen funktionell zusammengehöriger Gene eingesetzt (Apoptose: n= 435, Zellzyklus: n=317 Gene). Dargestellt sind nur die Gene, die den größten Beitrag an der signifikant angereicherten Genregulation leisten, bewertet über den Anteil an der Reduktion der Fehlerquadratsumme.

○ **strahlenempfindlich**

○ **unempfindlich**



II.2.2 Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Während Vergleiche von Genexpressions-Daten aus unterschiedlichen Plattformen noch vor wenigen Jahren meistens nur einen relativ geringen Grad an Übereinstimmung aufwiesen, hat sich durch die Weiterentwicklung sowohl der Techniken als auch der statistischen Verfahren zur Datenanalyse eine erhebliche Verbesserung ergeben. *Surnimal und Amundson* (2008) haben zur Entwicklung biodosimetrischer Marker zu mehreren Zeitpunkten (6h und 24h) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (0.5, 2, 5 und 8Gy) genomweite Genexpressionsprofile an peripheren Blutlymphozyten erstellt und ein prädiktives Genset von 74 strahleninduzierbaren Genen zur Abschätzung der Strahlendosis herausgearbeitet. 50% dieser Gene wurden in unserem Ansatz ebenfalls als strahlen-abhängig identifiziert, wobei auch das Ranking der am stärksten regulierten Gene gute Übereinstimmung mit unseren Daten zeigt. In beiden Gensätzen findet sich eine deutliche Anreicherung an p53 regulierten Genen.

Obwohl die Zahl an Publikationen, in denen Microarrays zur Analyse strahlenbedingter Schäden im Normalgewebe nach wie vor limitiert ist, unterstützen die Daten von zwei in 2006 und 2007 publizierten Arbeiten unseren Ansatz, Genexpressionsprofile für die Entwicklung prädiktiver Tests zur Abschätzung von Strahlenschäden einzusetzen. In einer Pilotstudie an 5 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren konnten während dem Verlauf einer Chemo-Radiotherapie Veränderungen im Genexpressionsprofil peripherer Blutlymphozyten nachgewiesen werden. Durch die auch bei uns eingesetzte Spezialsoftware (IPA, Ingenuity), wurden 14 für die lokale Toxizität relevante „pathways“ identifiziert (*Sonis et al. 2007*). Obwohl die Probenzahl klein war, zeigen die Ergebnisse, dass durch eine Chemoradiotherapie induzierte genetische Veränderungen an Lymphozyten nachgewiesen werden können und dass diese Veränderungen teilweise mit der klinischen Entwicklung von akuter Toxizität im Bestrahlungsfeld einhergehen.

Svensson et al. (2006) erstellten an Blutproben von 21 Prostata-Karzinom-Patienten mit starken Nebenwirkungen nach Strahlentherapie und 17 Patienten ohne vergleichbare Symptome genomweite Expressionprofile 24h nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 2 Gy. Ein Satz von 72 strahlen-induzierbaren Genen klassifizierte in diesem Kollektiv 63% der Patienten mit strahlenbedingten Spätschäden korrekt. Diese Zahl konnte durch Verwendung betroffener Gensets anstelle einzelner Gene auf 86% erhöht werden.

Trotz nach wie vor bestehender Limitierungen bei der Dateninterpretation, dem Vergleich von Datensätzen, die mit unterschiedlichen Analyse-Plattformen erstellt wurden, und Aspekten der Gewebeheterogenität stellt die Analyse von Genexpressionsprofilen mittels

Microarrays eine revolutionäre und vielversprechende Technik dar, die bei geeignetem Experiment-Design nützliche und interpretierbare Daten auf diesem Gebiet liefern wird.

II.3. Institut für Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München

II.3.1. Erzielte Ergebnisse

II.3.1.1. Analyse der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-Kapazität nach *in vitro*-Bestrahlung

Zur Bestimmung der Doppelstrangbruch-Reparatur-Kapazität wurde die strahleninduzierte Phosphorylierung des Histons H2AX untersucht.

Nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) durch ionisierende Bestrahlung kommt es in einer sehr frühen Reaktion der Zellen zur Phosphorylierung des Histons H2AX zu γH2AX, welches mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann. Dabei ist die Anzahl der γH2AX-Foci ein Maß für die Zahl der vorhandenen Doppelstrangbrüche. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Reparatur-Assays liegt in der hohen Sensitivität selbst bei geringen Bestrahlungsdosen von etwa 1 mGy (Löbrich & Kiefer, 2004).

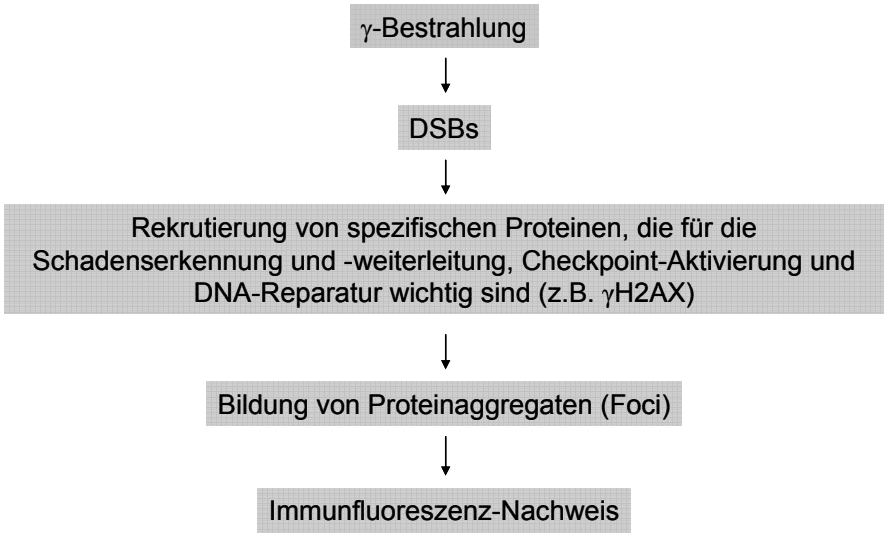


Abb. II.3.1: Schematische Darstellung des Versuchsprinzips des γH2AX-Assays
Durch γ-Bestrahlung entstandene DNA-Doppelstrangbrüche führen u.a. zu Bildung von γH2AX-Foci, die anschließend über verschiedene Methoden der Immunfluoreszenz (Mikroskopie, Durchflusszytometrie) nachgewiesen werden können.

Pro Versuchsreihe wurden sowohl die primären Patientenzellen (a + b), als auch die zugehörigen lymphoblastoiden Patienten-Zelllinien (c + d), sowie die jeweilige KORA-Kontrolle und die Standard-Kontrollzelllinie (1k) untersucht. Dafür wurden die primären Lymphozyten 24 h vor Versuchsbeginn in Kultur genommen, die lymphoblastoiden Zelllinien hingegen wurden acht Tage zuvor bereits aufgetaut, damit sich diese zum Zeitpunkt des Experiments in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Anschließend wurden die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten (15 min, 1 h, 4 h, 24 h) nach Bestrahlung mit 2 Gy bzw. ohne Bestrahlung nach 24 h geerntet und fixiert, um eine weitere Erkennung und Reparatur der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche zu verhindern. Daraufhin erfolgte die Markierung von γH2AX mit Hilfe eines spezifischen primären Antikörpers (*Anti-phospho-Histidine H2A.X (Ser139), clone JBW301, UPSTATE*), der hierauf mittels eines Fluorochrom-dekorierten sekundären Antikörpers (*Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen*) nachgewiesen werden konnte. Ein Teil der Zellen wurde für eine eventuelle spätere, mikroskopische Analyse auf Objektträger aufgebracht, der andere Teil wurde direkt im Anschluss an die Probenaufbereitung im Durchflusszytometer untersucht.

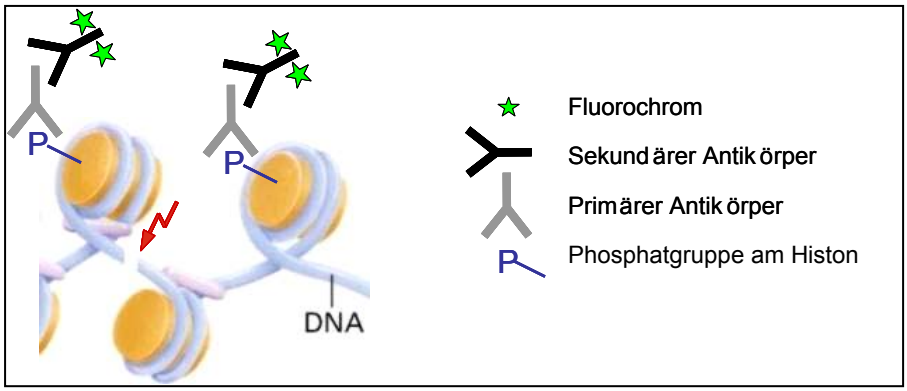


Abb. II.3.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des γH2AX-Assays
Ein spezifischer primärer Antikörper erkennt phosphoryliertes H2AX und bindet daran. In einem zweiten Schritt wird dieser mittels eines sekundären Antikörpers markiert, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist und somit einen Immunfluoreszenz-Nachweis ermöglicht.

Zur statistischen Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde der Median der Fluoreszenz bei 530 nm als Berechnungsgrundlage verwendet. Dabei wurde deutlich, dass die lymphoblastoiden Zelllinien generell sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Zustand eine deutlich höhere Fluoreszenz aufwiesen als die primären Patientenzellen. Dies spricht für einen größeren Hintergrundschaden, der durch die stark proliferative Aktivität der immortalisierten Zelllinien erklärt werden kann.

Um die Induktion der H2AX-Phosphorylierung zu bestimmen, wurden die Medianwerte der bestrahlten Proben jeweils durch den Median der unbestrahlten Kontrollprobe dividiert (z.B. 7b, 2 Gy, 15 min / 7b, 0 Gy, 24 h). Dabei konnte beobachtet werden, dass die primären Lymphozyten in den meisten Fällen eine stärkere Induktion zeigten als die Zelllinien. Dies lässt sich mit dem erhöhten Hintergrundschaden in den lymphoblastoiden Zelllinien erklären. Durch Verwendung von höheren Dosen könnte diese Schwierigkeit möglicherweise beseitigt werden. Zudem konnte in den primären Patientenzellen eine größere Schwankungsbreite festgestellt werden, die aber auch teilweise auf die unterschiedliche Probenqualität zurückzuführen ist. So traten beispielsweise bei einem Teil des Patientenmaterials bereits kurze Zeit nach dem Auftauen zu über 90% nekrotische Zellen (siehe Ergebnisse Apoptose-Assay) auf, von denen keine Strahlenreaktion mehr erwartet werden kann.

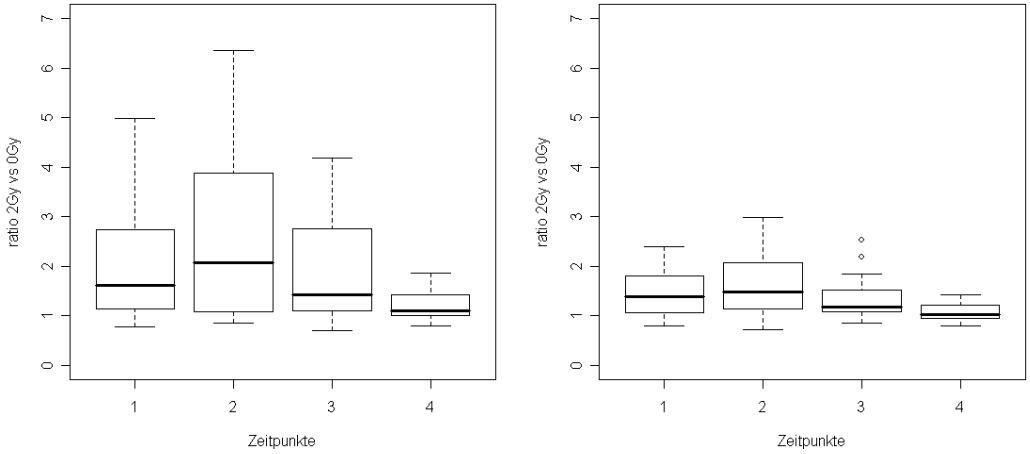


Abb. II.3.3: Boxplots der relativen Fluoreszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung
1 = 15 min, 2 = 1 h, 3 = 4 h, 4 = 24 h. Rechts: primäre Lymphozyten, Links: Zelllinien.
Viele der primären Lymphozyten zeigen höhere Effekte als die Zelllinien. Das Maximum ist bei 1h sichtbar.

Bei der genaueren Analyse der H2AX-Phosphorylierung nach Einteilung der Zellen in die beiden unterschiedlichen Gruppen (strahlenempfindlich vs. strahlenunempfindlich) zeigte sich, dass die primären Lymphozyten der strahlenunempfindlichen Patienten die höchste Induktion aufwiesen. Dies deutet auf eine verminderte Schadenserkennung und damit verbunden auch eine möglicherweise reduzierte Schadensprozessierung in dem strahlenempfindlichen Patientenkollektiv hin. Ebenso traf diese Beobachtung auch für die lymphoblastoiden Zelllinien, wenn auch weniger stark ausgeprägt, zu. Es konnte also bezogen auf das Verhalten im Kollektiv eine Korrelation zwischen primären Lymphozyten und lymphoblastoiden Zelllinien nachgewiesen werden.

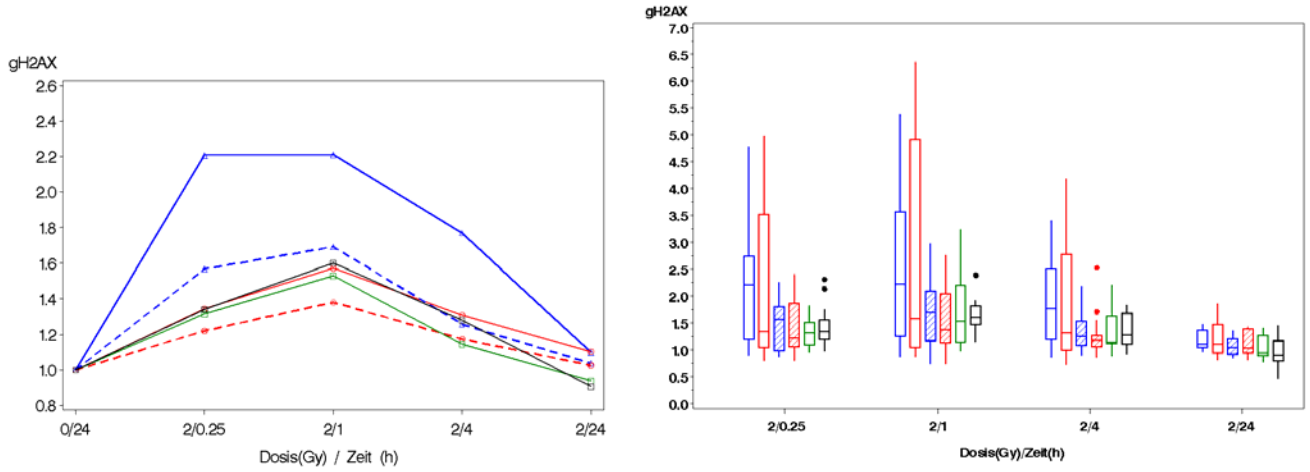


Abb. II.3.4: Liniendiagramme und Boxplots der relativen Fluoreszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung
blau: primäre Lymphozyten (strahlenunempfindlich), blau-gestrichelt: Zelllinien (strahlenunempfindlich), rot: primäre Lymphozyten (strahlenempfindlich), rot-gestrichelt: Zelllinien (strahlenempfindlich), grün: gematchte KORA-Kontrollen, schwarz: Standard-Kontrolle (1k).
Es kann sowohl bei den primären Lymphozyten als auch bei lymphoblastoiden Zelllinien eine höhere Induktion der H2AX-Phosphorylierung im Kollektiv der strahlenunempfindlichen Patienten (UE) im Vergleich zu dem Kollektiv der strahlenempfindlichen Patienten (E) nachgewiesen werden.

II.3.1.2 Analyse der Apoptose-Induktion nach in vitro-Bestrahlung

Zur Bestimmung der Apoptose-Induktion wurde die strahleninduzierte Apoptose mit Hilfe des AnnexinV-Assays untersucht.

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. Bei Verwendung eines AnnexinV-FITC (*Fluorescein Isothiocyanat*)-Konjugates können apoptotische Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz im Durchflusszytometer spezifisch nachgewiesen werden. Durch gleichzeitige Färbung mit Propidiumjodid (PI) können tote (nekrotische) Zellen detektiert werden, die aufgrund ihrer defekten Plasmamembranen PI inkorporieren.

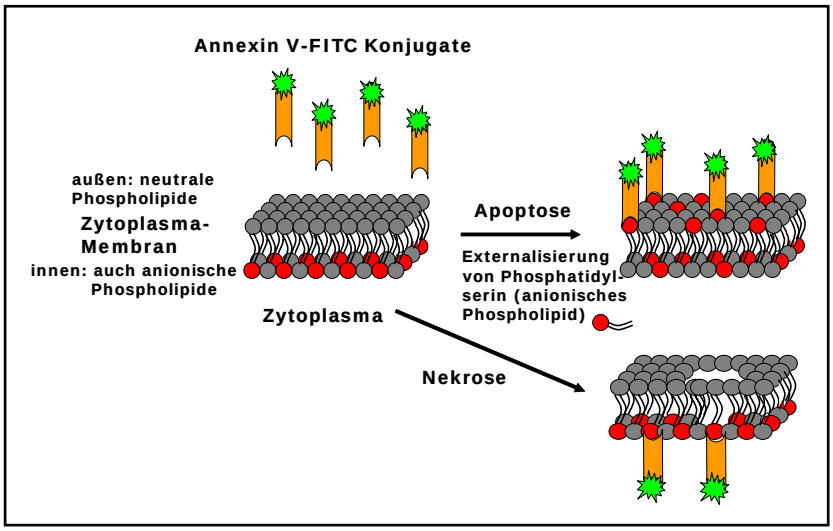


Abb. II.3.5: Schematische Darstellung des Versuchsprinzips des AnnexinV-Assays
Apoptotische Zellen können aufgrund der Externalisierung von Phosphatidylserin mittels AnnexinV nachgewiesen werden. Dahingegen sind nekrotische Zellen aufgrund von Schäden in der Zytoplasmamembran, durch die sowohl AnnexinV als auch PI in die Zellen eindringen können, zweifach gefärbt.

Für diesen Versuch wurde ein Aliquot der Zellen, die für die γH2AX-Analyse in Kultur genommen wurden, verwendet, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit beider Methoden zu gewährleisten. Die Zellen wurden 48 h nach Bestrahlung mit 0,4 Gy und 0,8 Gy geerntet. Anschließend erfolgte zunächst eine Färbung mit spezifischen, Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen T- und B-Lymphozyten (*CD3/CD19-APC, CALTAC*), um eventuelle Verunreinigungen des Probenmaterials mit anderen Zellpopulationen (z.B. Granulozyten, Monozyten etc.) aus der Analyse auszuschließen. Nach Zugabe von AnnexinV und PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Im Fall der primären Patientenzellen ließen sich eindeutig die drei Subpopulationen (lebend, apoptotisch und nekrotisch) auftrennen. Bei den lymphoblastoiden Zelllinien war dies nicht möglich, weshalb diese aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden. Ein möglicher alternativer Test zur Bestimmung der Apoptose in EBV-immortalisierten Zelllinien wurde angedacht, konnte allerdings im Rahmen dieses Projekts nicht mehr umgesetzt werden.

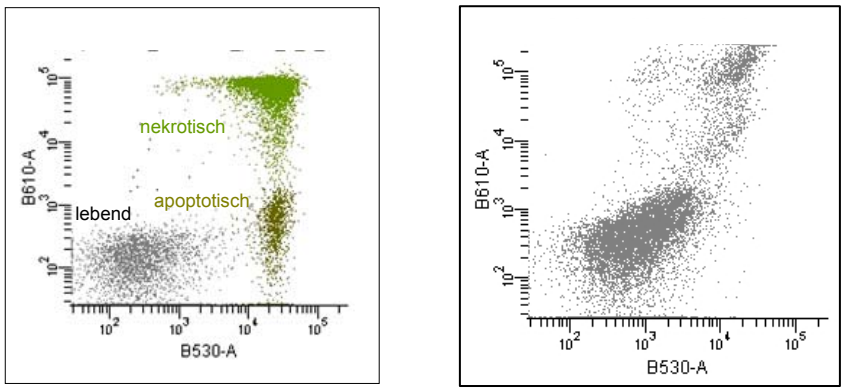
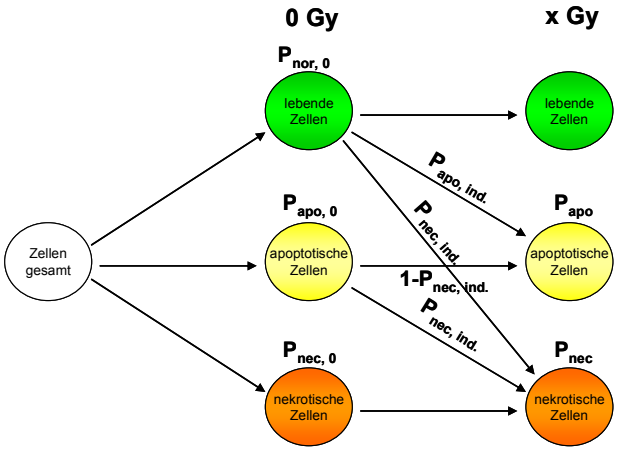


Abb. II.3.6: DotPlots der durchflusszytometrischen Analyse des AnnexinV-Assays
Rechts: primäre Lymphozyten, Links: Zelllinien.
In primären Lymphozyten zeigen sich in der durchflusszytometrischen Analyse drei Zellpopulationen. Bei lymphoblastoiden Zelllinien hingegen ist diese Unterscheidung nicht möglich.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer Formel, die im Rahmen des Strahlenschutz-Projekts 4439 von Herrn Braselmann (Institut für molekulare Strahlenbiologie, Helmholtz Zentrum München) entwickelt wurde. Dabei wurde zunächst berücksichtigt, dass im verwendeten Probenmaterial bereits vor Bestrahlung die drei Subpopulationen (lebend, apoptotisch und nekrotisch) vorhanden sind. Nur lebende Zellen können sich strahleninduziert auf alle drei Populationen verteilen, wohingegen apoptotische bzw. nekrotische Zellen in ihrem Zustand verweilen oder sich im Falle der apoptotischen Zellen lediglich in nekrotische umwandeln können. Zudem musste beachtet werden, dass die jeweilige Verteilung der Subpopulationen innerhalb der Proben bereits ohne Bestrahlung erheblich variiert, was ebenfalls in die Formel mit einberechnet wurde.



apoptotische: $$P_{apo,ind} = \frac{P_{apo} - P_{apo,0} \cdot (1 - \frac{P_{nec,ind}}{100})}{100 - P_{apo,0} - P_{nec,0}} \times 100$$

nekrotische: $$P_{nec,ind} = \frac{P_{nec} - P_{nec,0}}{100 - P_{nec,0}} \times 100$$

($P_{nor} + P_{apo} + P_{nec} = 100$, bei 0 und bei x Gy)

Abb. II.3.7: Berechnung der strahleninduzierten Apoptose
Rechts: Dargestellt ist die Verteilung der Zellen innerhalb der drei Subpopulationen vor und nach Bestrahlung und die zugehörige Wahrscheinlichkeitsverteilung. Links: Formel zur Berechnung der strahleninduzierten Apoptose und Nekrose

Mit Hilfe des AnnexinV-Assays konnte überdies die Anfangsnekrose in unbestrahlten Patientenzellen ermittelt werden. Es zeigte sich, dass bei einigen Proben bereits initial eine sehr hohe Nekroserate von über 90 % festzustellen ist. Da in diesen Fällen keine Antwort der Zellen auf Bestrahlung mehr möglich ist, sollten diese bei der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden, um eine biologisch sinnvolle Analyse der Daten zu gewährleisten.

	a		b	
	Anfangsnekrose	*Anfangsnekrose + Anfangsapoptose*	*Anfangsnekrose*	*Anfangsnekrose + Anfangsapoptose*
1	□	□	□	□
2	■	■	□	□
3	□	□	□	□ 79%
4	□	□	■	■
5	□	□	■	■
6	■	■	■	■
7	■	■	□	□
8	□	□	■	■
9	□	□ 79%	□	□
10	■	■	■	■
11	□	□	□	■
12	□	□	■	■
13	□	□	□	□
14	■	■	□	□
15	□	□	□	■

■ ≥ 90%
■ 80% < 90%
□ Durchschnittlich: 50% ≤ 78%

Abb. II.3.8: Anfangsnekrose und initialer Anteil toter Zellen innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs
Einige Proben wiesen bereits ohne Bestrahlung einen sehr hohen Anteil nekrotischer bzw. toter Zellen auf. Bei der Datenanalyse sollten diese Fälle nicht mit in die Auswertung mit einbezogen werden.

Allgemein zeigte sich bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten eine Induktion der Apoptose sowohl bei 0,4 Gy als auch bei 0,8 Gy. Wie erwartet, stieg die strahleninduzierte Apoptoserate mit steigender Dosis ebenfalls an. Zudem konnten in beiden Fällen Probanden mit stark erhöhter Apoptose identifiziert werden.

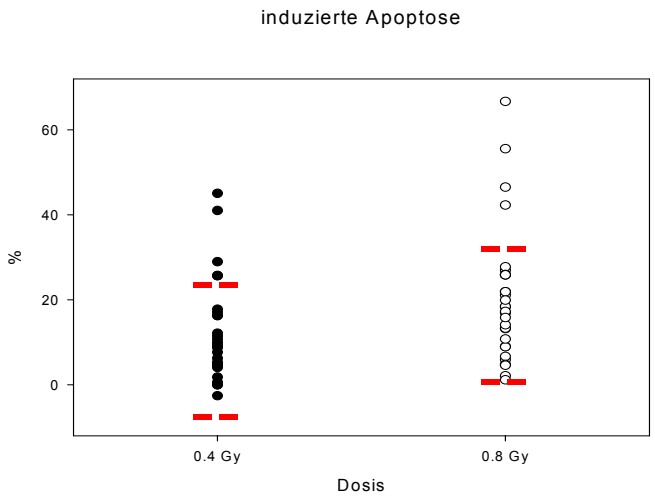


Abb. II.3.9: Streudiagramm der induzierten apoptotischen Zellen in % bei 0,4 Gy und 0,8 Gy von allen Testprobanden.
Rote Linien repräsentieren das Streubreitenintervall (± 2.5 Standardabweichungen) bei der Standardkontrolle zentriert um die Mediane der Testprobanden. Werte oberhalb des Intervalles sind Kandidaten für erhöhte Apoptose-Reaktion.

Nach Unterteilung der Patienten in die beiden unterschiedlichen Gruppen (strahlenempfindlich vs. strahlenunempfindlich) konnte bei Bestrahlung mit 0,4 Gy eine etwa gleich starke Apoptose-Induktion beobachtet werden. Bei höherer Dosis zeigte sich zwar in beiden eine Zunahme der strahleninduzierten Apoptoserate, diese war jedoch im Fall des strahlenempfindlichen Patientenkollektivs deutlich weniger stark ausgeprägt.

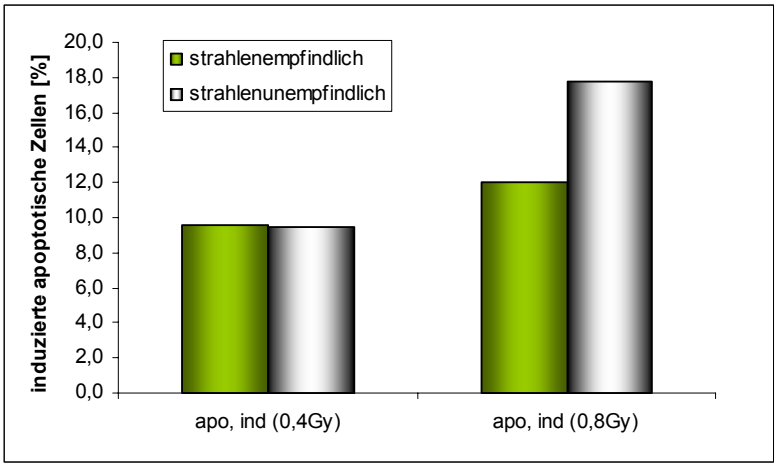


Abb. II.3.10: Induzierte Apoptose bei 0,4 Gy und 0,8 Gy nach Einteilung der Patienten in die beiden Gruppen (strahlenempfindlich vs. strahlenumempfindlich)
Bei 0,4 Gy zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Mit steigender Dosis konnte lediglich eine schwache Zunahme bei den strahlenempfindlichen Patienten im Vergleich zu der strahlenunempfindlichen Kontrollgruppe festgestellt werden.

II.3.1.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Da aufgrund des limitierten primären Patientenmaterials nicht generell Doppelbestimmungen durchgeführt werden konnten, wurden stichprobenartig zwei Versuchsreihen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der ermittelten Ergebnisse zu überprüfen. Es zeigte sich bei den primären Lymphozyten eine relativ gute Übereinstimmung sowohl für den AnnexinV-Assay als auch für die γH2AX-Analyse.

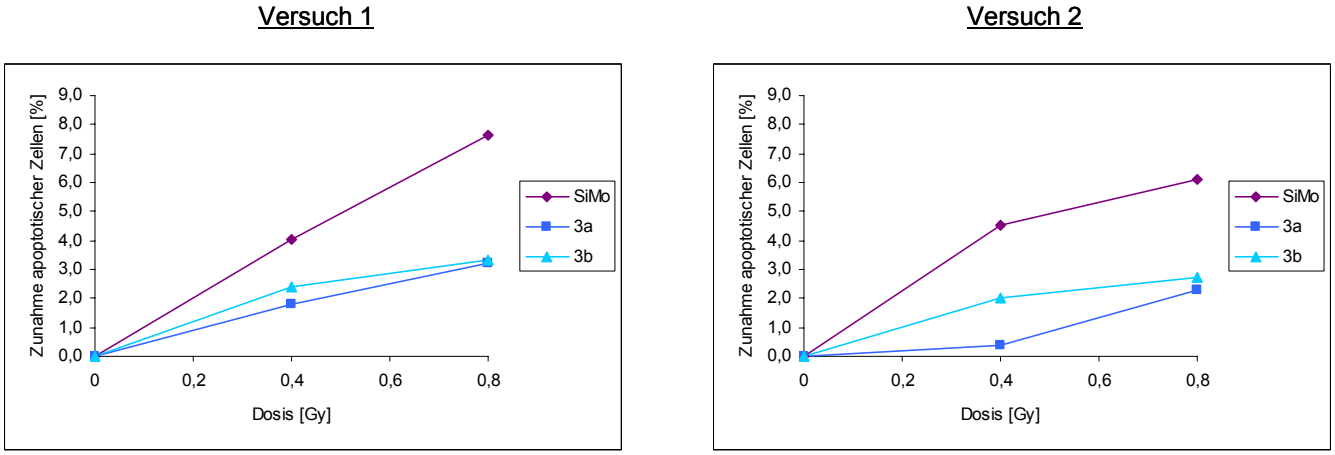


Abb.II.3.11: Exemplarische Darstellung zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des AnnexinV-Assays
Bei den durchgeführten Wiederholungsversuchen zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der gewonnenen Daten beider Experimente.

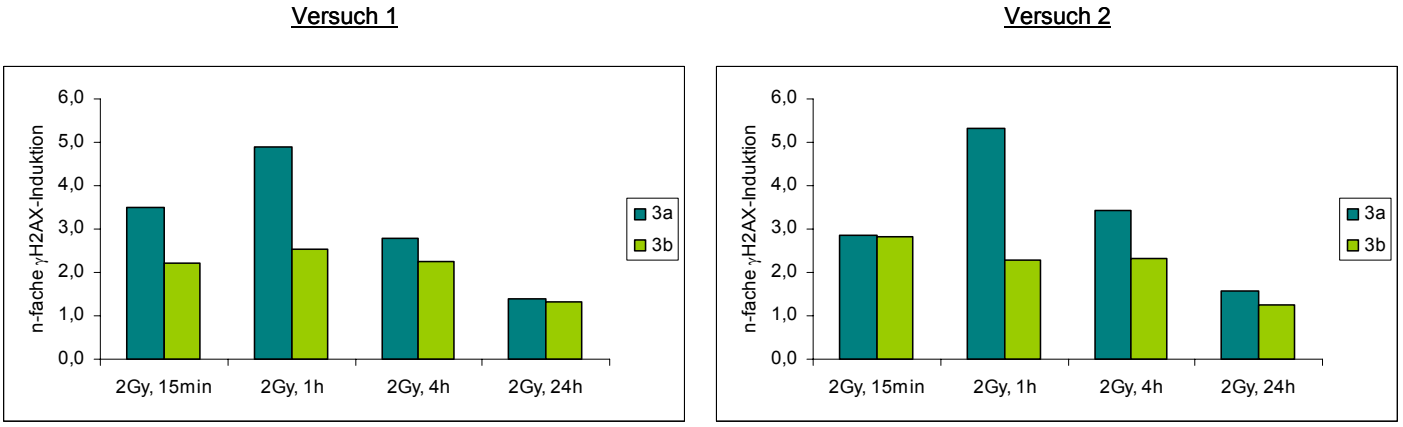


Abb.II.3.12: Exemplarische Darstellung zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der γH2AX-Analyse
Bei den durchgeführten Wiederholungsversuchen zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der gewonnenen Daten beider Experimente.

Bei den lymphoblastoiden Zelllinien zeigte sich bei Bestrahlung mit 2 Gy eine wesentlich geringere Induktion der H2AX-Phosphorylierung im Vergleich zu den primären Lymphozyten. Dadurch kam es zu geringeren Unterschieden zwischen den einzelnen Zelllinien, die bei Wiederholungsversuchen die experimentellen Schwankungen überdeckten. Somit sind Aussagen über eine mögliche Korrelation bezüglich der Strahlenempfindlichkeit in Linien und primären Lymphozyten nur schwer zu treffen.

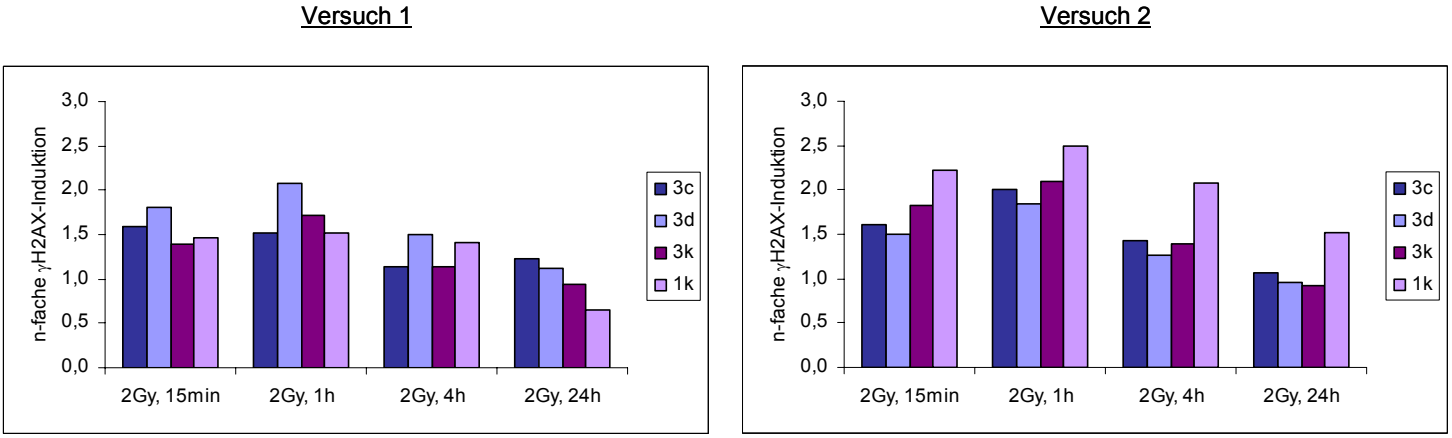


Abb.II.3.13: Exemplarische Darstellung der γH2AX-Analyse in lymphoblastoiden Zelllinien
Es zeigte sich, dass aufgrund der geringeren Induktion der H2AX-Phosphorylierung die interexperimentellen Schwankungen stärker ins Gewicht fallen und somit eine Korrelation der Daten von primären Lymphozyten und lymphoblastoiden Zelllinien erschweren.

II.4. Leibniz-Institut für Altersforschung – FLI Jena

II.4.1. Erzielte Ergebnisse

II.4.1.1. Apoptose

Die Strahlen-induzierte Apoptose wurde vergleichend an primärem Lymphozyten-Material strahlenempfindlicher und strahlenunempfindlicher Kopf-Hals-Tumor- sowie Mammakarzinom-Patienten analysiert. Um experimentell bedingte Schwankungen der Versuchsergebnisse aufzeichnen zu können, wurden hier bei jedem Versuch primäre Lymphozyten eines einzigen gesunden Spenders mit analysiert. Diese interne Kontrolle soll im Folgenden als laborinterne Standardkontrolle (HD) bezeichnet werden. Zusätzlich zu den primären Lymphozyten sollte auch getestet werden, in wie fern EBV-immortalisierte Lymphozyten als Modellsystem für die limitierten primären Lymphozyten geeignet sind. Alle Messungen wurden also ebenfalls mit den aus den Patientenzellen generierten Zelllinien durchgeführt. Auch für die Zelllinien gab es eine Standardkontrolle, welche die experimentelle Schwankungsbreite des Assays verdeutlichen sollte. Diese Kontrolle wurde in allen beteiligten Labors eingesetzt und soll deshalb im Folgenden als laborübergreifende Standardkontrolle (1k) bezeichnet werden.

Zur Bestimmung der Strahlen-induzierten Apoptose wurden alle 15 Zellgruppen [Xa, Xb, HD (prim. Zellen), Xc, Xd, Xk, 1k (Zelllinien)] mit der in Vorläuferprojekten für primäre Lymphozyten etablierten Methode des Annexin V / PI-Assays durchflusszytometrisch analysiert. Es erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit 0,4 bzw. 0,8Gy Gammastrahlung (^{137}Cs / 1,23 Gy/min), eine anschließende Inkubation für 48h und letztlich eine Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) in Kombination mit einer Markierung der B- und T-Lymphozyten mittels CD3/CD19-Oberflächenmarkern. Diese kombinierte Methode erlaubt die standardisierte Erkennung apoptotischer B- und T-Zellen vor dem Hintergrund anderer Blutzellen, die im Verlauf der Blutzell-Isolierung als Verunreinigung auftreten können. Die Kultivierung, Bestrahlung, Färbung und Messung aller Proben einer Zellgruppe erfolgte stets an den gleichen Versuchstagen. Es bestand lediglich ein Unterschied in der Kultivierungsdauer von primären Lymphozyten und Zelllinien. Während die primären Zellen stets 24h vor der Bestrahlung aufgetaut wurden, erfolgte bei den Zelllinen stets eine Kultivierung von 8 Tagen bevor mit der Bestrahlung begonnen wurde, um hier ein logarithmisches Wachstum zu gewährleisten.

Schon in der Etablierungsphase des Projektes wurde deutlich, dass die Methode des AnnexinV / PI-Assays für primäre Lymphozyten sehr gut geeignet ist, aber die Zelllinien

verändert reagieren. In Abb.II.4.1 ist ein Vergleich der beiden Zelltypen am Beispiel der Standardkontrollen HD und 1k gezeigt. Während eine Dosis von 0,8Gy in primären Lymphozyten eine deutliche Apoptose-Reaktion auslöst, ist in den Zelllinien kein signifikanter Anstieg apoptotischer Zellen zu beobachten. Dies könnte in der Immortalisierung durch das EB-Virus begründet liegen, da zahlreiche EBV-Proteine bekannt sind, welche verschiedenste Wege der Apoptose-Induktion hemmen (Henderson *et al.* 1993, Cahir-McFarland. *et al.* 2000, Lee *et al.* 2004, Zou *et al.* 2007).

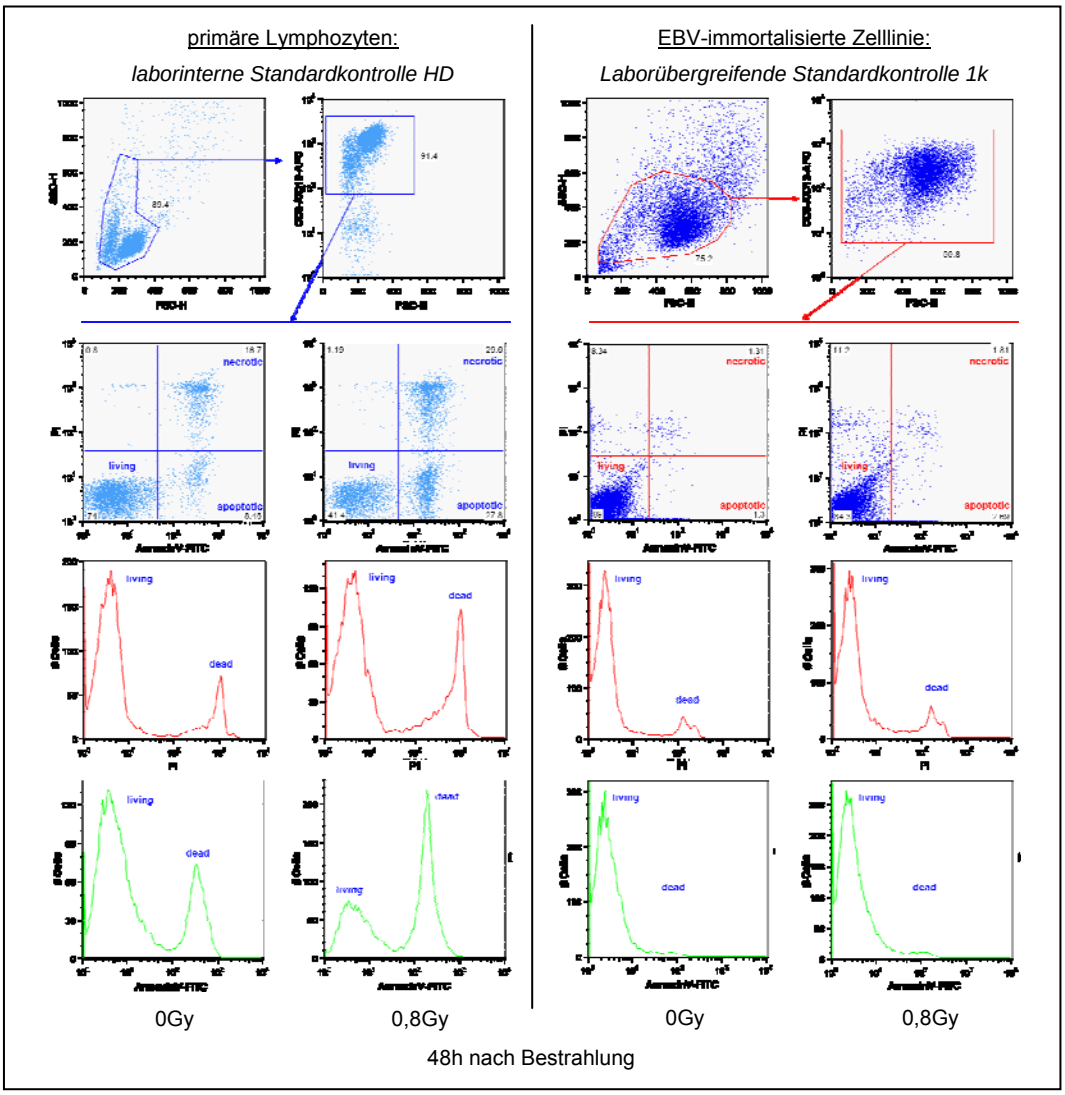


Abb. II.4.1: Apoptose-Messung in primären Lymphozyten und Zelllinien nach 0Gy bzw. 0,8Gy Gammabestrahlung und 48h Inkubationszeit
Dargestellt ist das Gating-Schema und die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose nach 0,8Gy Gammabestrahlung. Reihe 1: *FSC/SSC*; Reihe 2: Annexin V / PI, Reihe 3: PI (Histogramm); Reihe 4: Annexin V (Histogramm). Eine Dosis von 0,8 Gy löst in den Zelllinien keinen signifikanten Zelltod aus.

Um zu überprüfen, ob ein Vergleich der Zelllinien mit ihren Ursprungs-Lymphozyten dennoch möglich ist, wurden für die laborübergreifende Standardkontrolle 1k sowohl erhöhte Strahlendosen als auch verlängerte Inkubationszeiten nach Bestrahlung,

ausgetestet. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abb.II.4.2a zu sehen. Bei einer 10-fach erhöhten Strahlendosis (von 0,4Gy auf 4Gy und 0,8Gy auf 8Gy) ist im Annexin V / PI-Assay nach 72h ein deutlicher Anstieg der PI-positiven Zellen zu verzeichnen, jedoch lassen sich die Annexin V-positiven Zellen (apoptotisch) nicht eindeutig von den Annexin V-negativen (lebend) trennen. Eine Kompensation der Fluoreszenzkanäle des FACS-Gerätes und damit eine exakte Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen in der Population erwiesen sich daher als nahezu unmöglich. Ein zum Annexin V / PI-Assay parallel durchgeführter subG1-Assay (Zellzyklusfärbung mit PI in Ethanol-fixierten Zellen) zeigte jedoch eine deutliche, dosis-abhängige Akkumulation toter Zellen (subG1). Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte Strahlendosen trotz Inhibierung des Apoptose-Signalweges durch EBV-Proteine eine Apoptose-Reaktion auslösen können. Der Prozentsatz dieser Zellpopulation liegt bei diesen Dosen allerdings deutlich unter den Vergleichs-Werten für primäre Lymphozyten (Daten hier nicht gezeigt).

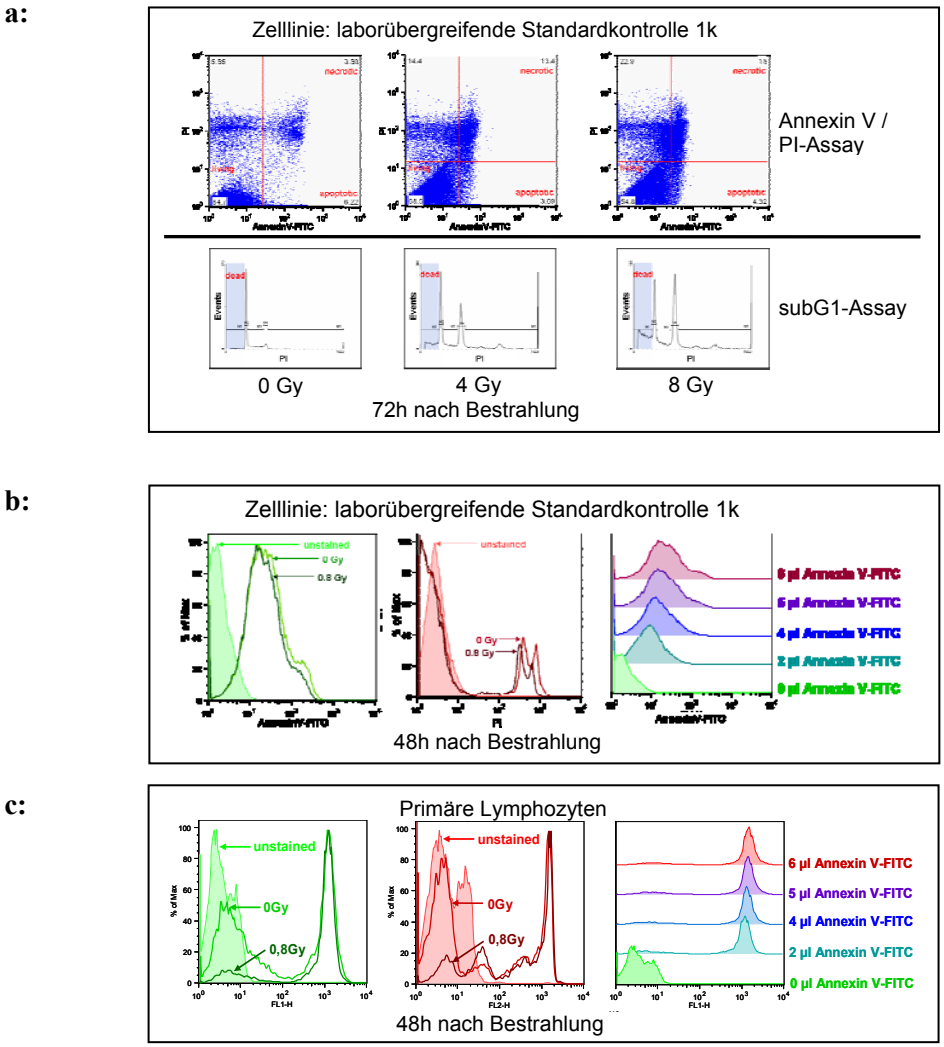


Abb.II.4. 2: Apoptose-Messung in Zelllinien und primären Lymphozyten mittels Annexin V / PI-Assay
a: *Vergleich des Annexin V / PI-Assays mit dem subG1-Assay:* Bestrahlung der laborübergreifenden Standartkontrolle 1k mit 0Gy, 4Gy bzw. 8Gy Gammabestrahlung und 72h Inkubationszeit. *oben:* Im Annexin V / PI-Assay lassen sich apoptotische (Annexin V-positiv) Zellen nicht klar von lebenden (Annexin V-negativ) abgrenzen. *unten:* Der subG1-Assay zeigt tote Zellen. **b, c:** *Annexin V / PI-Assay mit steigender Annexin V-Konzentration im Färbeansatz:* Das Annexin V-FITC- (grün) und PI-Histogramm (rot) zeigen, dass die Kontrolle 1k (**b**) im Vergleich zu primären Lymphozyten (**c**) nach 0,8Gy Gammabestrahlung nicht in Zelltod geht. Eine Färbung der selben Proben mit steigender Annexin V-Konzentration zeigt in der Kontrolle 1k einen Anstieg des Fluoreszenzsignales (**b**), unabhängig von der Bestrahlung, was auf eine unspezifische Bindung des Annexin V schließen lässt. Dies ist bei primären Lymphozyten nicht zu beobachten (**c**).

Da im Annexin V / PI-Assay die Annexin V-positiven Zellen nicht von den Annexin V-negativen Zellen zu trennen waren, sollte überprüft werden, ob die Zelllinien das Annexin V unspezifisch binden. Dazu wurde der Annexin V / PI-Assay wie gewohnt mit 0 Gy und 0,8 Gy durchgeführt, jedoch wurden die Proben mit unterschiedlichen Annexin V-Konzentrationen gefärbt. Wie zu erwarten, zeigen primäre Lymphozyten (Abb.II.4.2c) eine deutliche Apoptose-Induktion (Annexin V- und PI-Histogramm), aber die Annexin V-Fluoreszenz steigt durch eine erhöhte Annexin V-Konzentration im Reaktionsansatz nicht weiter an (rechts). Die Zelllinien zeigen hier ein anderes Bild. Obwohl die Zellen bei einer

Dosis von 0,8 Gy nicht sterben (Abb.II.4.2b Annexin V- und PI-Histogramm) steigt die Annexin V-Fluoreszenz mit steigender Annexin V-Konzentration in den einzelnen Reaktionsansätzen (Abb.II.4.2b rechts). Letzteres sollte in vitalen Zellen nicht auftreten, da das Annexin V-bindende Phosphatidylserin nur auf der Membraninnenseite zu finden ist. Eine unspezifische Bindung des Annexin V an die Zelllinien erscheint also wahrscheinlich. Um zu klären, ob diese unspezifische Bindung eine Folge der Immortalisierung durch EBV ist, wurde der Annexin V /PI-Assay mit EBV-unabhängigen Leukämiezelllinien (HL60, Jurkat) wiederholt. Entgegen der Erwartungen war jedoch auch hier keine Trennung von Annexin V-positiven und Annexin V-negativen Zellen möglich (Daten nicht gezeigt). Dass eine Veränderung der Zelloberfläche durch die Expression verschiedener EBV-Proteine in der Wirtszelle als spezifische Ursache für die Probleme im Annexin V-Assay verantwortlich ist, erscheint daher unwahrscheinlich. Viel mehr scheint generell die Immortalisierung und (partielle) neoplastische Transformation der Zellen – durch EBV oder andere Ereignisse – die Anwendung des AnnexinV-Assays zu stören.

Als mögliche Alternative für den Annexin V / PI-Assay sollte eine neu entwickelte Methode vorgeschlagen werden, welche eine Kombination aus Zellzyklusfärbung nicht-fixierter Zellen (Vybrant violet) und Lebend-Tot-Ausschluss durch PI-Färbung darstellt. Bislang nicht an primärem Lymphozyten-Material getestet, erzielte sie aber in den Zelllinien eine saubere Trennung von lebenden und toten Zellen, sowie eine deutliche Dosisabhängigkeit bei 0Gy, 2Gy und 4Gy Gammabestrahlung (Daten hier nicht gezeigt).

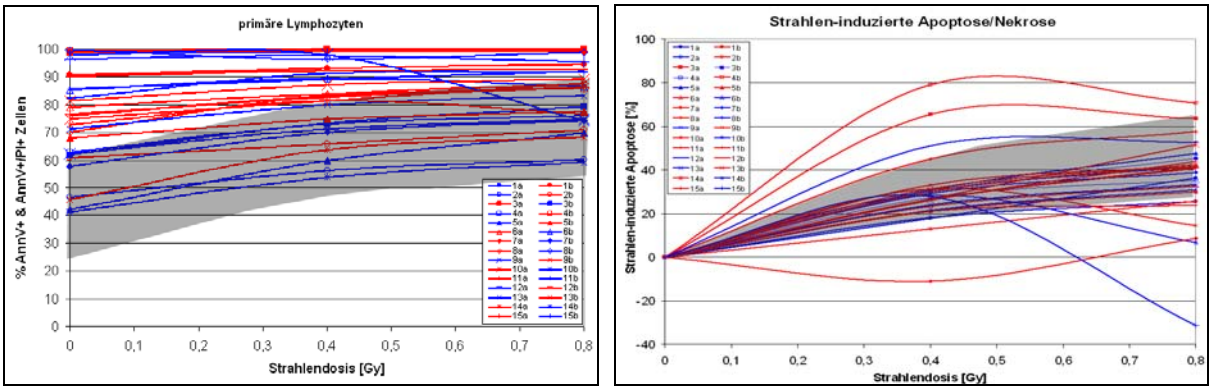
Aus Zeitgründen wurde im weiteren Verlauf des Projektes jedoch nicht nach einem alternativen Apoptose-Assay gesucht und die oben vorgeschlagene Methode nicht weiter optimiert. In Abb.II.4.3 sind daher nur die Messergebnisse des Annexin V / PI-Assays für die primären Patienten-Lymphozyten gezeigt. Als apoptotisch wurden immer alle Annexin V-positiven Zellen bezeichnet, also neben den Annexin V-einzelpositiven auch die Annexin V- / PI-doppelpositiven.

Wie in Abb.II.4.3a zu sehen ist, war das primäre Lymphozyten-Material vieler Patientenproben in einem schlechten Zustand. Die meisten Proben zeigen schon ohne Gammabestrahlung einen deutlich höheren Anteil an toten Zellen (spontane Apoptose) als die an jedem Versuchstag mitgeführte laborinterne Standardkontrolle HD (grauer Bereich). Hier beträgt der Anteil an spontan apoptotischen Zellen zwischen 25 und 60%,

während bei 14 von 30 Patientenproben die spontane Apoptose-Rate über 80% liegt und bei 9 dieser Proben sogar über 90%. Eine Dosis-abhängige Apoptose-Induktion, wie bei der laborinternen Standardkontrolle HD zu beobachten, ist bei spontanen Apoptose-Raten über 90% in dieser Darstellungsweise nicht mehr festzustellen. Aus diesem Grund wurde die strahleninduzierte Apoptose, also der Anteil an toten Zellen, welcher allein durch die Bestrahlung ausgelöst wurde, in Abb.II.4.3b so berechnet, dass nur die in der unbestrahlten Kontrolle noch lebenden Zellen als Ausgangspunkt dienen [Formel: $A_{ind} = (A_{xGy}-A_{0Gy})/(100\%-A_{0Gy})x100$]. Durch diese Neuberechnung der strahleninduzierten Apoptose wird deutlich, dass sich die Apoptose-Induktion nahezu aller Patientenproben innerhalb der Schwankungsbreite der laborinternen Standardkontrolle HD befindet. Bei den Proben welche deutlich über diesem Bereich liegen (4b, 3a) beziehungsweise deutlich darunter (7a), handelt es sich um Zellmaterial, welches spontane Apoptose-Raten über 90% aufwies, sodass eine strahleninduzierte Apoptose hier vermutlich nur sehr ungenau berechnet werden kann. Gleiches gilt für die Patientenproben 6b und 15b, welche bei 0,8Gy Gammabestrahlung eine geringere Apoptose-Rate aufweisen als bei 0,4Gy.

Vergleicht man nun die in Abb.II.4.3b berechneten strahleninduzierten Apoptose-Raten der einzelnen Patientengruppen (Abb.II.4.3d), so zeigt sich zwar eine breitere Streuung der strahlenempfindlichen Patienten, doch liegen die Mediane beider Patientengruppen und selbst die der laborinternen Standardkontrolle HD auf nahezu dem gleichen Niveau. Eine Unterscheidung der Untergruppen strahlenempfindlicher und strahlenunempfindlicher Patienten ist hier also nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Aspekt betrachtet. In Abb.II.4.3c ist ein Vergleich der spontanen Apoptose-Raten beider Patientengruppen gezeigt. Aber auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

a: **b:**



c: **d:**

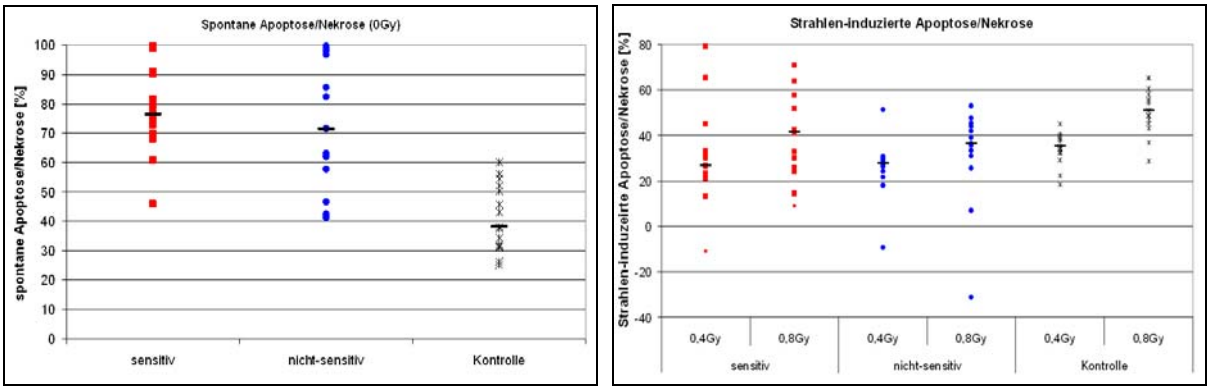


Abb.II.4. 3: Apoptose-Messung in primären Lymphozyten nach 0 Gy, 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy Gammabestrahlung und 48h Inkubationszeit

a: absolute Apoptose/Nekrose-Kurven aller primären Lymphozyten-Proben; Für jede Probe ist die Summe Annexin V-positiver und Annexin V / PI-doppelpositiver Zellen aus dem Lymphozytengate (CD3/CD19-positiv) gezeigt. **b:** Strahlen-induzierte Apoptose/Nekrose berechnet nach: $A_{ind} = (A_{xGy}-A_{0Gy})/(100\%-A_{0Gy})x100$; *rot:* strahlenempfindlich, *blau:* strahlenunempfindlich, *grauer Bereich:* experimentell ermittelte Schwankung der laborinternen Standardkontrolle (HD) an den 15 verschiedenen Versuchstagen (ohne entsprechende Einzelkurven) **c:** Vergleich der spontanen Apoptose/Nekrose-Raten (0Gy) unter den einzelnen Patientengruppen. **d:** Vergleich der Strahlen-induzierten Apoptose/ Nekrose unter den einzelnen Patientengruppen; schwarze Balken = Median der Apoptose/Nekrose-Raten

II.4.1.2. H2AX-Phosphorylierung

II.4.1.2.1. FACS-Analyse

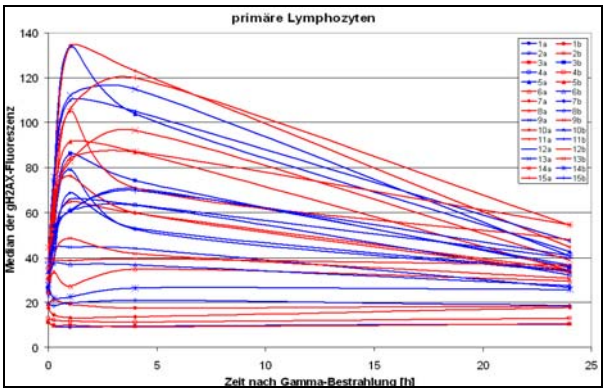
Vergleich der strahlenempfindlichen mit „gematchten“ strahlenunempfindlichen Patientenproben

Die Phosphorylierung des Histon Proteins H2AX wurde vergleichend an primärem Lymphozyten-Material strahlenempfindlicher und strahlenunempfindlicher Kopf-Hals-Tumor- sowie Mammakarzinom-Patienten analysiert. Zusätzlich zu den primären Lymphozyten sollte auch getestet werden, in wie fern EBV-immortalisierte Lymphozyten als Modellsystem für die limitierten primären Lymphozyten geeignet sind. Alle Messungen wurden also ebenfalls mit den aus den Patientenzellen generierten Zelllinien durchgeführt. Für die Zelllinien gab es eine Standardkontrolle, welche die experimentelle Schwankungsbreite des Assays verdeutlichen sollte. Diese Kontrolle wurde in allen beteiligten Labors eingesetzt und soll deshalb im Folgenden als laborübergreifende Standardkontrolle (1k) bezeichnet werden.

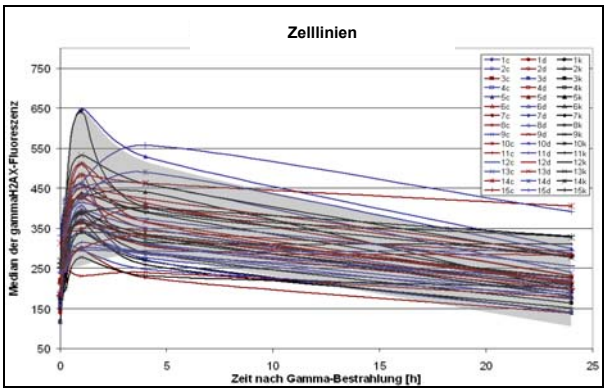
Zur Bestimmung des strahleninduzierten Schadensniveaus und zur Ermittlung der Reparatur-Kapazität wurden alle 15 Zellgruppen [Xa, Xb (prim. Zellen), Xc, Xd, Xk, 1k (Zelllinien)] auf Eis mit 2 Gy Gammastrahlung (^{137}Cs / 1,23 Gy/min) behandelt und anschließend für 15min, 1h, 4h und 24h bei 37°C inkubiert. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit anti-γH2AX-Antikörpern markiert. Mit einer anschließenden Färbung der Zellen mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor 488) kann letztlich die Summe der γH2AX-spezifischen Fluoreszenzintensitäten durchflusszytometrisch bestimmt werden. Da die Phosphorylierung des Histon-Proteins H2AX zum γH2AX als Marker für Doppelstrangbrüche gilt, kann der Median dieser Fluoreszenzintensitäten als Maß für DNA-Reparatur-Kinetiken nach strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen verwendet werden.

Die Kultivierung, Bestrahlung, Färbung und Messung aller Proben einer Zellgruppe erfolgte stets an den gleichen Versuchstagen. Die Reparaturkinetiken aller 30 primären Lymphozyten-Proben sind in Abb.II.4.4a dargestellt und die der 45 Zelllinien in Abb.II.4.4b.

a:



b:



c:

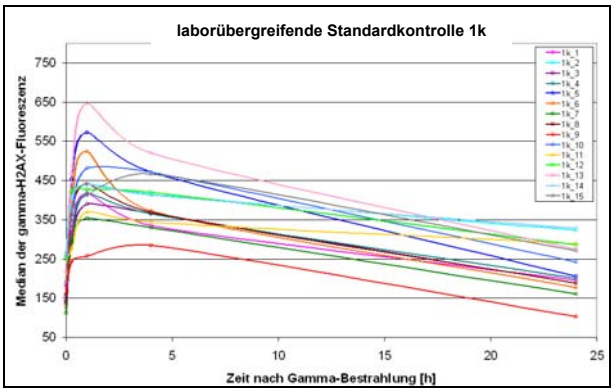


Abb. II.4.4: Durchflusszytometrische Analyse der Histon H2AX-Phosphorylierung nach 2Gy Gammabestrahlung
a: primäre Lymphozyten, **b:** Zelllinien, **c:** laborübergreifende Standardkontrolle (1k) gemessen an den 15 verschiedenen Versuchstagen. Gezeigt sind die durchfluss-zytometrisch ermittelten Mediane der Fluoreszenz-intensitäten (γH2AX) der Gesamt-populationen aufgetragen gegen die Zeit nach Bestrahlung; *a,b: rot:* strahlenempfindlich, *blau:* strahlen-unempfindlich, *grauer Bereich:* experimentell ermittelte Schwankung der laborübergreifenden Standardkontrolle (1k) an den 15 Versuchstagen (ohne entsprechende Einzelkurven)

Die Kinetiken beider Zelltypen sind sich äußerst ähnlich. Es erfolgt eine rasche Induktion der Phosphorylierung des Histon-Proteins, welche nach 1-4h ihr Maximum erreicht und eine kontinuierliche Dephosphorylierung, welche 24h nach Bestrahlung nahezu das Ausgangsniveau wieder hergestellt hat. Die interindividuellen Unterschiede der Reparaturkinetiken sind in beiden Zelltypen allerdings stark ausgeprägt (Vgl. Abb.II.4.4a+b). Sowohl unter den primären Lymphozyten als auch unter den Zelllinien gibt es Proben, welche nach Bestrahlung rasch phosphorylieren, das Maximum nach 1h erreichen und dann wieder schnell dephosphorylieren (z.B. Abb.II.4.4a: 5a, 11a; Abb.II.4.4b: 5c, 14k). Dagegen stehen Proben, welche ebenfalls zunächst rasch phosphorylieren, aber dann nur langsam dephosphorylieren. Bei diesen Proben liegt das Phosphorylierungs-Maximum zwischen 1h und 4h nach Bestrahlung (z.B. Abb.II.4.4a: 10a, 15a; Abb.II.4.4b: 14d, 15d).

Bei den primären Lymphozyten (Abb.II.4.4a) ist weiterhin auffällig, dass die Strahlung in einigen Proben keine H2AX-Phosphorylierung zu induzieren scheint. Dies sind jedoch Proben, welche im Apoptose-Assay schon in der unbestrahlten Kontrolle über 80% tote Zellen aufwiesen, sodass anzunehmen ist, dass hier mit totem Zellmaterial gearbeitet

wurde und damit keine Strahlenreaktion zu erwarten war. Ob die Unterteilung der Proben in „rasche Dephosphorylierer“ und „langsame Dephosphorylierer“ jedoch auf intrinsische Ursachen der Patientenproben zurückzuführen ist, ist ungewiss. In Abb.II.4.4c ist die Reparaturkinetik der laborübergreifenden Standardkontrolle 1k an den 15 verschiedenen Versuchstagen gezeigt. Hier wird eine starke Schwankungsbreite deutlich. Selbst die Kinetiken der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung zeigen nicht immer den gleichen Verlauf. So erscheint die laborübergreifende Standardkontrolle 1k manchmal als „rascher“ (z.B. 1k_6, 1k_13) und manchmal als „langsamer Dephosphorylierer (z.B. 1k_10, 1k_15). Diesen beiden unterschiedlichen Kinetiken liegt also vermutlich keine genetische Komponente zu Grunde. Sie repräsentiert vielmehr Schwankungen in den Kultivierungs- und Versuchsbedingungen.

Dies belegt auch eine statistische Analyse der strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patientenproben mittels Chi-Quadrat-Test (Tab.II.4.1). Die beiden Patientengruppen wurden bezüglich ihres maximalen Phosphorylierungs-Zeitpunktes (1h oder 4h) untereinander verglichen. Es wurde hier davon ausgegangen, dass Proben, welche ihr Maximum nach 1h erreicht haben „rasche Dephosphorylierer“ und Proben welche erst nach 4h ihr Maximum erreicht hatten „langsame Dephosphorylierer“ sind. Dies ist möglich, da die Proben mit einem 4h-Maximum immer „langsame Dephosphorylierer“ und Proben mit einem 1h-Maximum häufig „rasche Dephosphorylierer“ waren (Abb.II.4.4). Der Chi-Quadrat-Test belegt jedoch, dass „rasche“ bzw. „langsame Dephosphorylierer“ bei strahlenempfindlichen Patienten ähnlich häufig auftreten wie bei strahlenunempfindlichen (Tab.II.4.1; p_{prim}=0,7486, p_{EBV}=0,6242, $p_{prim+EBV}$=0,8726). Dies weist wiederum auf eine kultivierungs- und versuchsbedingte Ursache der verschiedenen Kinetiken hin. Eine klare Korrelation des Phänotyps „rascher“ bzw. „langsamer Dephosphorylierer“ mit dem Versuchstag kann jedoch ebenfalls nicht ausgemacht werden.

Geht man davon aus, dass starke Schwankungen der Kultivierungsbedingungen hauptsächlich in den Zelllinien auftreten, da diese proliferieren und damit einer größeren Anzahl an Kultivierungs-Parametern unterliegen als primäre G0-Phase-Lymphozyten, so könnte dies bedeuten, dass die laborübergreifende Standardkontrolle 1k nur die enorme Schwankung der immortalisierten Zellen widerspiegelt und die primären Lymphozyten deutlich geringeren Schwankungen unterliegen. Da in diesem Projekt aufgrund der

enormen Probenmenge eines Versuchstages keine primäre Standardkontrolle für den γH2AX-Assay vorgesehen war, kann dies nicht bewiesen werden. Ein Hinweis dazu liefern aber die Apoptose-Daten aus Münster. Hier wurden alle Patientenproben in Form von Triplikatbestimmungen gemessen. Diese zeigten, dass die Apoptose-Daten der primären Lymphozyten sehr gut reproduzierbar waren, die Zelllinien aber schon hier deutlichen Schwankungen unterlagen (persönliche Kommunikation mit Dr. Burkhard Greve).

Tab.II.4.1: Chi-Quadrat-Test für die Beurteilung einer signifikanten Beziehung von „raschen und „langsamen Dephosphorylierern“ zu strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patientenproben

Gezeigt sind die p-Werte für die primären Lymphozyten, die Zelllinien und eine kombinierte Analyse beider Zelltypen zusammen. Der Test überprüft die Unabhängigkeit dem Strahlenstatus (strahlenempfindlich/strahlenunempfindlich) und der Phosphorylierungskinetik (rasche/langsame Dephosphorylierer). Unter der Nullhypothese (p>0,05) stimmen die beobachteten Häufigkeiten mit den erwarteten bei Unabhängigkeit überein, d.h. ein Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden.

Primäre Lymphozyten						
	Summe	*erwartet*		*beobachtet*		*p*
		1h	*4h*	*1h*	*4h*	
strahlenunempfindlich	12	7,64	4,36	8	4	0,7486
strahlenempfindlich	10	6,36	3,64	6	4	

Zelllinien						
	Summe	*erwartet*		*beobachtet*		*p*
		1h	*4h*	*1h*	*4h*	
strahlenunempfindlich	15	12,5	2,5	12	3	0,6242
strahlenempfindlich	15	12,5	2,5	13	2	

Beide Zelltypen zusammen						
	Summe	*erwartet*		*beobachtet*		*p*
		1h	*4h*	*1h*	*4h*	
strahlenunempfindlich	27	20,5	6,75	20	7	0,8727
strahlenempfindlich	25	18,75	6,25	19	6	

Neben dem zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung kann auch die absolute Phosphorylierung der Histon-Proteine zu den verschiedenen Zeitpunkten betrachtet werden, um einen Vergleich der strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patientenproben anzustellen. In Abb.II.4.5. sind sowohl für die primären Lymphozyten (**a**) als auch für die Zelllinien (**b**) die Mediane der γH2AX-Fluoreszenzen beider Patientengruppen gegenübergestellt. Probenpaare, welche sich ähnlich verhalten liegen auf der Diagonalen und voneinander abweichende Proben sind davon entfernt. Verhält sich also ein strahlenempfindlicher Patient im zellulären Assay anders als sein „gematchter“ strahlenunempfindlicher Partner, kann dies an den dargestellten

Punktdiagrammen abgelesen werden. In beiden Zelltypen ist deutlich zu sehen, dass die Streuung der Histon H2AX-Phosphorylierung mit der Stärke der Phosphorylierung zu und wieder abnimmt. Das heißt, bestrahlte Proben, denen 15min, 1h bzw. 4h Reparaturzeit gewährt wurden zeigen deutliche interindividuelle Unterschiede. Ein Trend dazu, dass strahlenempfindliche Proben stärker phosphoryliert werden als die „gematchten" strahlenunempfindliche Proben oder andersherum lässt sich aber in beiden Zelltypen nicht erkennen.

Bei den primären Lymphozyten-Proben (Abb.II.4.5a) sind Patientenpaare zu erkennen, welche in beide Richtungen stark von der Diagonalen abweichen. Diese wurden mit rot gekennzeichnet. Schon wie in Abb.II.4.4a durch eine fehlende Phosphorylierung des Histon-Proteins zu sehen, treten auch hier wieder die Proben heraus, welche im Apoptose-Assay über 90% tote Zellen in der unbestrahlten Kontrolle zeigten. „Gematchte" Testpaare, bei welchen einer der beiden Partner eine Apoptose-Rate über 90% zeigte, unterscheiden sich stark (rot), Testpaare, bei welchen beide Partner über 90% apoptotische Zellen enthielten unterscheiden sich kaum, zeigen aber auch nahezu keine Dynamik (grün) (Abb.II.4.5a). Es handelt sich bei den Unterschieden also offensichtlich nicht um genetische Varianz, sondern um Unterschiede in der Qualität des Zellmaterials. Eine Unterscheidung strahlenempfindlicher und strahlenunempfindlicher Patienten kann mit dem γH2AX-Assay unter den hier getesteten Versuchsbedingungen also nicht erzielt werden.

a: **primäre Lymphozyten** **b:** **Zelllinien**

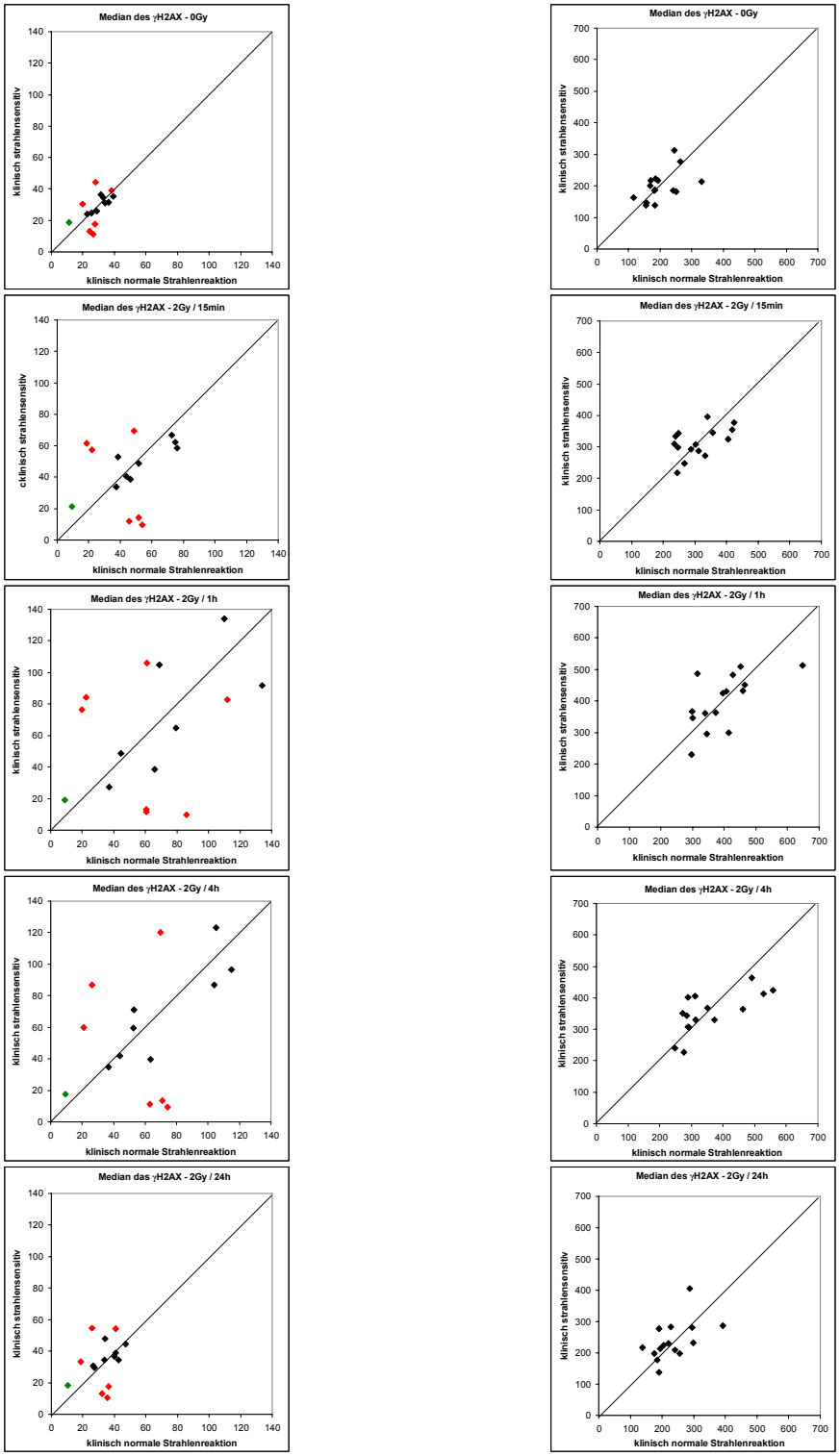
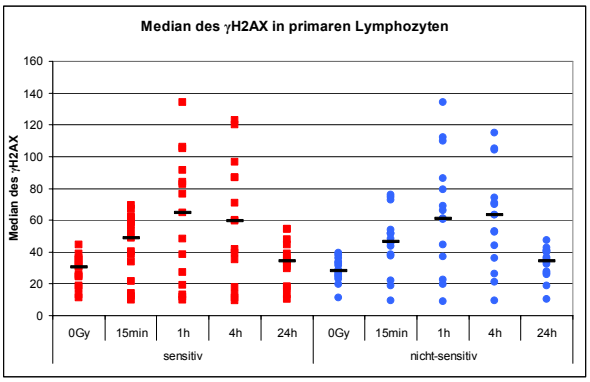


Abb. II.4.5: Gegenüberstellung der Histon H2AX-Phosphorylierung strahlenempfindlicher und „gematchter"strahlenunempfindlicher Patientenproben nach 2Gy Gammabestrahlung *in vitro*
a: primäre Lymphozyten; *rot:* Probenpaare bei denen eine Probe mehr als 90% tote Zellen in der unbestrahlten Kontrolle zeigte (Apoptose-Assay); *grün:* Probenpaare bei denen beide Proben mehr als 90% tote Zellen in der unbestrahlten Kontrolle zeigten (Apoptose-Assay). **b:** Zelllinien; Dargestellt sind die Mediane der Fluoreszenzintensitäten (γH2AX) der Gesamtpopulationen „gematchter" Vergleichspaare. Probenpaare, welche sich ähnlich verhalten liegen auf der mittleren Geraden und voneinander abweichende Proben sind davon entfernt.

Werden in Abb.II.4.6 nun die ermittelten Fluoreszenzintensitäten des γH2AX wie in Abb.II.4.4 in Form von Kinetiken betrachtet, jedoch alle Proben in zusammengefassten Gruppen, so wird deutlich, dass sich weder die strahlenempfindlichen (rot/dunkelrot) von ihren „gematchten“ strahlenunempfindlichen Partnern (blau/dunkelblau) unterscheiden, noch die Patienten von den „gematchten“ gesunden Proben (grün) und der Schwankung der laborübergreifenden Standardkontrolle 1k. Es ist deutlich zu sehen, dass alle Gruppen sich sehr ähnlich verhalten und die Gruppen-Mediane (schwarze Balken) sehr dicht beieinander liegen.

a:



b:

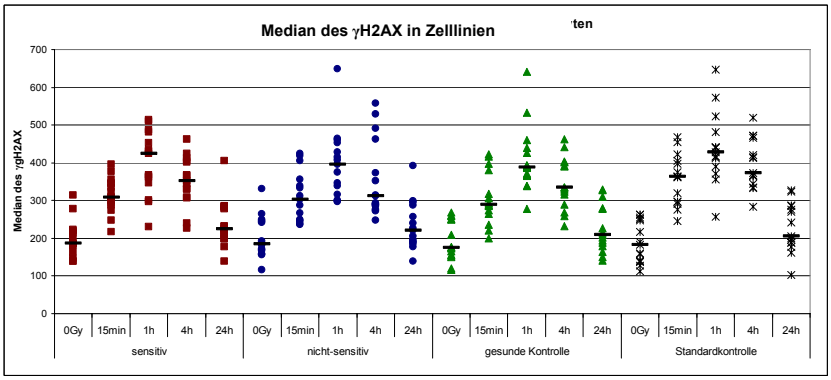


Abb.II.4. 6: Vergleich der Histon H2AX-Phosphorylierung in primären Lymphozyten (a) und Zelllinien (b) strahlenempfindlicher bzw. strahlenunempfindlicher Patienten
Dargestellt sind die durchflusszytometrisch ermittelten Mediane der Fluoreszenzintensitäten (γH2AX) der Gesamtpopulationen. *rot/dunkelrot:* strahlenempfindlich; *blau/dunkelblau:* zu rot „gematcht“, strahlenunempfindlich; *grün:* zu rot & blau „gematchte“ gesunde Proben; *schwarz:* laborübergreifende Standardkontrolle 1k an den 15 verschiedenen Versuchstagen; *schwarze Balken:* Median aller Proben einer Gruppe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Detektion der H2AX-Phosphorylierung methodisch sehr gut geklappt hat. In allen verwendeten Zelltypen (primär/immortalisiert) waren sehr schöne Kinetiken der Phosphorylierung erkennbar, die jedoch keine Diskriminierung der Zellen nach ihrer Strahlensensitivität erlaubte.

Die hier gezeigte, FACS-basierte Fluoreszenzauswertung der H2AX-Phosphorylierung (Mediane der Fluoreszenzintensitäten) wurde gewählt, um eine Standardisierung und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen experimentellen Labors zu erlauben. Eine mikroskopische Auswertung der γH2AX-Foci (siehe Punkt II.4.2.2) ist stark vom jeweiligen auswertenden Wissenschaftler und/oder der verwendeten Analyse-*Software* abhängig. Prinzipiell bietet sie jedoch die Möglichkeit, Größen- und Mengenverteilungen der Foci in den Zellen als zusätzliches Kriterium zu erfassen.

Vergleich der Zelllinien mit ihren primären Ursprungs-Lymphozyten

Während der einzelnen Messungen wurden die Unterschiede zwischen den primären Lymphozyten und den Zelllinien immer prägnanter. Zunächst fällt auf, dass das basale Schadensniveau, also die Phosphorylierung des Histon-Proteins H2AX ohne strahleninduzierte DNA-Schädigung, in den Zelllinien deutlich höher ist, als in den primären Ursprungs-Lymphozyten (Vgl. Abb.II.4.4a & b; Abb.II.4.7). Dies könnte in der Proliferation der Zelllinien begründet liegen. Während primäre Lymphozyten hauptsächlich in der G0-Phase vorliegen, gibt es eine Vielzahl von EBV-Proteinen (z.B. EBNA-2, EBNA-3C and LMP-1, zusammengefasst in Cohen 2000), welche den Zellzyklusarrest außer Kraft setzen und die Proliferation der Lymphozyten voran treiben. Es ist bekannt, dass während der DNA-Replikation Strangbrüche entstehen, welche anschließend repariert werden. Betrachtet man nun zusätzlich Zellen, welche eine rasche Proliferationsgeschwindigkeit haben und von Virusproteinen im Zellzyklus voran getrieben werden, so haben diese Zellen im Vergleich zu normalen Körperzellen oder gar G0-Phase-Zellen natürlicherweise ein höheres Schadensniveau.

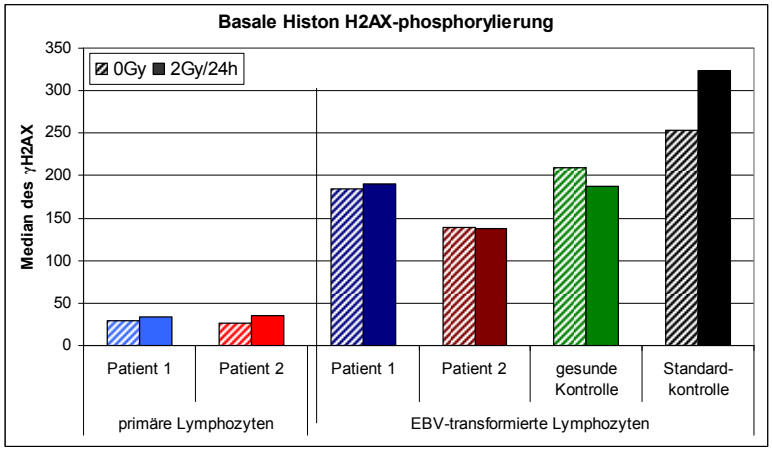


Abb.II.4.7: Basale Histon H2AX-Phosphorylierung in primären Lymphozyten und abgeleiteten Zelllinien
Dargestellt sind die durchflusszytometrisch ermittelten Mediane der Fluoreszenzintensitäten (γH2AX) der Gesamtpopulationen ohne (gestreift) und 24h nach 2Gy Gammabestrahlung (gefüllt). (repräsentativ ist Patientengruppe 2 gezeigt).

Während die basale H2AX-Phosphorylierung in den Zelllinien erhöht ist, scheint die strahleninduzierte H2AX-Phosphorylierung geringer zu sein (Abb.II.4.8). Als strahleninduziert wurde der Anteil der H2AX-Phosphorylierung bezeichnet, welcher nach Bestrahlung zusätzlich zu dem basalen Phosphorylierungs-Niveau induziert wurde (P_{xGy}/P_{0Gy}). Die geschilderte Beobachtung deutet darauf hin, dass die EBV-Immortalisierung zu einer Art Strahlenresistenz führt. Die Veränderung könnte aber auch mit den unterschiedlichen Zellzyklusstadien der verschiedenen Zelltypen zusammenhängen. Dies wurde mit verschiedenen FACS-Techniken weiter untersucht. Die Zelllinien wurden bestrahlt, nach verschiedenen Reparaturzeiten geerntet, fixiert und mit Anti-γH2AX-Antikörpern gefärbt. Die Proliferation der Zellen wurde gleichzeitig entweder mit einer einfachen PI-Färbung nachgewiesen oder durch die Markierung der S-Phase-Zellen mit einem Nukleotidanalogon und einer gleichzeitigen Zellzyklusfärbung. Die Analyse der Histon H2AX-Phosphorylierung in den einzelnen Zellzyklusphasen zeigte, dass G1-Phase-Zellen eine geringere γH2AX-Fluoreszenz haben als S- und G2/M-Phase-Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte lediglich an dem erhöhten DNA-Gehalt der S-und G2/M-Phase-Zellen liegen, oder aber auf eine tatsächlich verschiedene Strahlensensitivität hindeuten. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft muss durch weitere Experimente geklärt werden. Der Vergleich der γH2AX-Analyse in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit den Ergebnissen aus den primären G0-Phase-Lymphozyten und den proliferierenden Zelllinien deutet also darauf hin, dass der Unterschied in der H2AX-Phosphorylierung zwischen beiden Zelltypen in der Proliferation der Zelllinien begründet liegt. Weitere Analysen müssen zeigen, ob dies der einzige Grund ist, oder ob in der Wirtszelle exprimierte EBV-Proteine zusätzlich zu einer Art Strahlenresistenz führen. Hierzu werden momentan Versuche durchgeführt, in welchen primäre Lymphozyten mit proliferierenden primären und EBV-immortalisierten Zelllinien verglichen werden.

Die erwähnte Verringerung der strahleninduzierten H2AX-Phosphorylierung in den Zelllinien konnte in 14 von 30 Zellpaaren (primär gegen Zelllinie) beobachtet werden. Das ist zwar nur die Hälfte aller Proben, jedoch könnte dies mit dem nicht-vitalen Ausgangsmaterial zusammenhängen. Denn die erniedrigte γH2AX-Induktion konnte immer dann nicht festgestellt werden, wenn die strahleninduzierte H2AX-Phosphorylierung in den primären Lymphozyten-Proben ganz ausblieb. Diese fehlende Phosphorylierung korrelierte stets, wie schon oben erwähnt, mit den hohen Raten

spontan apoptotischer Zellen im Annexin V / PI-Assay. Denn bei 9 von 30 primären Lymphozyten-Proben betrug die spontane Apoptose-Rate schon in der unbestrahlten Kontrolle über 90% und bei weiteren 5 Proben immerhin noch über 80%.

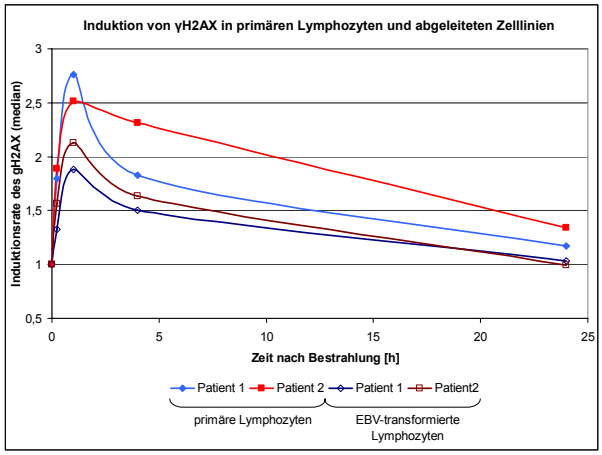


Abb.II.4.8: Strahleninduzierte Histon H2AX-Phosphorylierung in primären Lymphozyten und abgeleiteten Zelllinien
Dargestellt sind die Induktionsraten der medianen H2AX-Phosphorylierung nach Bestrahlung mit 2Gy Gammastrahlung, aufgetragen gegen die Zeit nach Bestrahlung. Eine EBV-Immortalisierung führt nach Gammastrahlung zu erniedrigten γH2AX-Induktionsraten. (Repräsentativ ist Patientengruppe 2 gezeigt).

Die Immortalisierung der primären Patienten-Lymphozyten mit EBV scheint also zu Veränderungen der zellulären Antwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden zu führen. Weitere Analysen müssen klären, ob dies ausschließlich an der Proliferation der Zelllinien liegt oder tiefgreifendere Ursachen hat.

II.4.1.2.2. Mikroskopische Analyse:

Die mikroskopische Auswertung der Histon H2AX-Phosphorylierung nach strahleninduzierten DNA-Schäden wurde nicht vorgenommen. Da die mikroskopische Auswertung (zählen von Foci) im Unterschied zur FACS-basierten Auswertung nicht frei von subjektiven Einflüssen ist und die Auswertung von 30 Objektträgern pro Versuchstag einen enormen Zeitaufwand erfordern würde, wurde gemeinsam mit dem Helmholtz Zentrum München entschieden, dass nur Objektträger analysiert werden, welche im FACS-basierten Assay interessante Ergebnisse zeigten. Alle mikroskopischen Proben wurden aber parallel zu den FACS-Proben gefärbt, auf Objektträger aufzentrifugiert und liegen bei -20°C für eine mikroskopische Analyse bereit. Da jedoch die FACS-basierenden Analysen bis zum Ende dieses Projektes keine klaren Unterschiede zwischen strahlenempfindlichen und „gematchten“ strahlenunempfindlichen

Patientenproben ergeben haben, wurden keine der 15 Zellgruppen mikroskopisch analysiert.

II.4.2. vorraussichtlicher Nutzen

II.4.2.1. Apoptose:

Eine Bestimmung der strahleninduzierten Apoptose *in vitro* mittels Annexin V / PI-Assay unter den hier angewandten Bedingungen ist nicht als Biomarker für klinische Strahlensensitivität geeignet. Innerhalb dieses Projektes konnte jedoch gezeigt werden, dass eine standardisierte Vorgehensweise bei der experimentellen Ausführung der Apoptose-Messung unabdingbar ist, um die Schwankungsbreite der Versuchsergebnisse so gering wie möglich zu halten, sodass eine experimentell bedingte Schwankung eine mögliche, genetisch begründete Tendenz nicht überlagert. Des Weiteren wurde deutlich, dass sehr hohe Ansprüche an das verwendete Zellmaterial gestellt werden sollten. Es wäre zu überdenken für weitere Tests stets frisch isolierte Lymphozyten zu verwenden. Innerhalb eines Ringprojektes wie diesem war es jedoch logistisch nicht möglich mit frischen Lymphozyten zu arbeiten, da alle beteiligten Labors das gleiche Ausgangsmaterial zur Verfügung haben sollten. Zudem sollte eine Verkürzung der Inkubationszeiten nach der Bestrahlung getestet werden, da die FACS-Analysen zeigten, dass stets der überwiegende Anteil der toten Zellen im nekrotischen bzw. spät apoptotischen Bereich zu finden war. Ein früherer Zeitpunkt könnte einerseits die hohen spontanen Apoptose-Raten senken, da diese mit längeren Kultivierungsdauern zunehmen und andererseits könnte ein Vergleich der sehr frühen Apoptosen in den einzelnen Versuchsgruppen einen empfindlicheren Marker für eine Strahlensensitivität darstellen.

Über die Erkenntnisse hinaus, welche die Standardisierung des Apoptose-Assays betreffen, sind eindeutige Hinweise darauf entstanden, dass EBV-immortalisierte Lymphozyten nur noch schwer mit den primären Ursprungszellen vergleichbar sind. Natürlich gibt es bereits eine Vielzahl von Studien, welche detailliert auf die neoplastischen Veränderungen EBV-immortalisierter Zellen eingehen. Jedoch werden diese häufig als Modellsysteme verwendet, um Rückschlüsse auf primäres Zellmaterial oder *in vivo* Situationen zu ziehen. Diese Studie zeigte jedoch dass Daten, welche in immortalisiertem Zellmaterial erhoben wurden stets kritisch zu hinterfragen und in *ex vivo* oder *in vivo* Studien zu belegen sind.

II.4.2.2. H2AX-Phosphorylierung

Der H2AX-Assay hat sich - im Unterschied zum Apoptose-Assay - als recht stabil erwiesen, bei der Anwendung sowohl an primären Lymphozyten als auch an Zelllinien. Eine Verwendung des Assays als Biomarker für klinische Strahlensensitivität ist jedoch nicht empfehlenswert. Da die Schwankung aller Gruppen genau der Schwankung der laborübergreifenden Standardkontrolle 1k entspricht, ist es möglich, dass die experimentelle Variabilität des Assays zu groß ist, um genetische Unterschiede feststellen zu können. Alternativ kann interpretiert werden, daß die klinische Strahlenempfindlichkeit nicht mit Unterschieden der H2AX-Phosphorylierung in kultivierten Patientenzellen korreliert.

Die außerdem beobachteten Unterschiede im γH2AX-Assay zwischen den primären Lymphozyten und den Zelllinien könnten auf der Proliferationsfähigkeit der Zelllinien beruhen, wodurch dieser Assay dann auch als zellulärer Proliferationsmarker, unabhängig vom Nachweis einzelner Replikationsproteine, einsetzbar wäre. Aber auch hier wieder ist darauf hinzudeuten, dass die Immortalisierung primärer Lymphozyten mit EBV zu gravierenden Veränderungen der zellulären Antwort auf strahleninduzierte DNA-Schäden zu führen scheint und demnach Daten, welche in Zelllinien erhoben wurden nur bedingt einer *in vivo* Situation entsprechen könnten und demnach kritisch hinterfragt und durch weitere Studien bestätigt werden sollten.

Das Ziel des Projektes, einen möglichen Biomarker für klinische Strahlensensitivität zu entdecken, konnte mit den gewählten Parametern und Methoden also nicht erreicht werden. Jedoch hat das Projekt maßgeblich dazu beigetragen, einzelne Assays zu optimieren und dadurch hohe Standards zu etablieren, um in Folgeprojekten einen fundierten Ausgangspunkt zu haben. Hierzu hat vor allem auch der Vergleich der Zelllinien mit ihren primären Ursprungs-Lymphozyten beigetragen. Denn während es zwischen den strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Zellen keine Unterschiede gab, konnten gravierende Gegensätze zwischen primären Lymphozyten und den Zelllinien festgestellt werden.

II.4.3. bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen

II.4.3.1. Apoptose

Eine 2006 veröffentlichte Studie von Severin *et al.* konnte die Strahlen-induzierte Nekrose von *in vitro* bestrahlten Lymphozyten mit dem Schweregrad der Mukositis von Ganzkörper-bestrahlten Leukämiepatienten korrelieren. Gleichzeitig war jedoch keinerlei Korrelation der Apoptose mit dem Schweregrad der Mukositis während der Therapie zu beobachten. Als nekrotisch wurden hier, anders als in der hier vorliegenden Studie, Zellen mit einem geringen DNA- und Proteingehalt bezeichnet. Während in der eben beschriebenen Studie die klinische Strahlensensitivität mit einem erhören Zelltod korrelierte zeigte eine Studie aus dem Jahre 2005 reduzierte Apoptose-Raten in *in vitro* bestrahltem, als klinisch strahlenempfindlich geltendem Zellmaterial (Wistop et al. 2005). Jedoch wurde die Apoptose-Messung hier mittels TUNEL-Assay in EBV-transformierten Zelllinien durchgeführt. Auch zeigten die generierten Zelllinien von strahlenempfindlichen Krebspatienten nur eine bedingte Korrelation, während die Zelllinien, welche von AT- oder NBS-Patienten stammten einen deutlicheren, wenn auch nicht eindeutigen, Zusammenhang der Apoptose und der klinischen Strahlenantwort aufwiesen.

Die widersprüchlichen Ergebnisse unterschiedlicher Studien sind schwer zu erklären, lassen sich aber auf die unterschiedlichen Assays und Zellmaterialien zurückführen. Gerade in der Studie von Wistop *et al.* wurden EBV-transformierte Zelllinien verwendet, welche sich in dem hier vorliegenden Projekt als äußerst ungeeignet für die Erhebung zellulärer Daten erwiesen haben.

Zahlreiche ältere Veröffentlichungen, welche sich mit der Strahlen-induzierten Apoptose in primären Lymphozyten beschäftigen, versprechen zwar interindividuelle Unterschiede erkennen zu können, eindeutige Korrelationen zu klinischer Strahlenempfindlichkeit von Krebspatienten während ihrer Strahlentherapie bleiben jedoch aus. Eine Studie von Schmitz *et al.* Aus dem Jahr 2007 deutet darauf hin, dass die Betrachtung der gesamten Lymphozyten-Population zu inhomogenen Ergebnissen führen könnte, da unterschiedliche Lymphozyten-Subpopulationen unterschiedlich stark auf Bestrahlung reagieren. Weitere Studien mit hoch standardisierten Versuchsabläufen und gut charakterisiertem Zellmaterial müssen in der Zukunft zeigen, ob die Apoptose, entgegen den hier gezeigten Ergebnissen, möglicherweise doch ein geeigneter Marker für klinische Strahlensensitivität sein kann.

II.4.3.2. H2AX-Phosphorylierung

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten sowohl mittels durchflusszytometrischer als auch immunhistochemischer Detektion der phosphorylierten Form des Histon H2AX-Proteins nach Gammabestrahlung strahlenempfindliche von strahlenunempfindlichen Zellen unterscheiden (Taneja et al. 2004, Olive et al. 2004). Jedoch wurden hier stets genetisch charakterisierte Modellsysteme, wie humane bzw. murine Tumorzelllinien verwendet. Stets konnte bei strahlenempfindlichen Zelllinien eine verzögerte Dephosphorylierung des Histon-Proteins beobachtet werden. Auch die Arbeitsgruppe um Christian Rübe zeigte kürzlich, dass die Analyse von γH2AX-Foci den Phänotyp verschiedener Reparatur-defizienter Mausstämme widerspiegelt, also einen Schluss auf die Strahlensensitivität zulässt (Rübe et al. 2008 a + b). Darüber hinaus schien die Kinetik der γH2AX-Foci in verschiedenen Organen bzw. im Blut nahezu identisch zu sein und eine *ex vivo*-Bestrahlung von Blut-Lymphozyten zeigte ähnliche Ergebnisse wie eine *in vivo*-Behandlung (Rübe et al. 2008 a + b). Diese Ergebnisse zeigen, dass der im vorliegenden Projekt verfolgte Ansatz – zumindest für genetisch charakterisierte Tumorzelllinien und Mausmodelle – die erhofften Resultate erbracht hat. Eine derartig klare Korrelation der H2AX-Phosphorylierung mit strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Tumorpatienten blieb bislang jedoch leider aus. Es gibt Analysen, welche belegen, dass die Detektion von γH2AX in humanen Lymphozyten strahlensensitiver Tumorpatienten ein sensitiver Marker für die Detektion von Doppelstrangbrüchen ist (Ismail et al. 2007,Sak et al. 2007). Hoch standardisierte Versuchsabläufe und Patienteneingruppierungen müssen in der Zukunft zeigen, ob die H2AX-Phosphorylierung auch auf klinischer Ebene ein Marker für Strahlensensitivität sein kann.

II.5. Interlaborvergleich – IMIB Münster

II.5.1. Apoptose

Die Analysen zu Apoptose wurden in den Laboren in Münster (UKM), Jena (FLI) und München (GSF) durchgeführt.

In einem Interlaborvergleich wurde die Reliabilität einer Annexin-V-basierten Zelltodanalyse bestimmt. Die Auswertungen beziehen sich dabei nur auf Ergebnisse primärer Lymphozyten, da aus bereits zuvor genannten Gründen eine Charakterisierung der immortalisierten Zelllinien nicht sinnvoll möglich war. Drei Labore waren in diesem Teil der Studie involviert, von denen zwei geringe Apoptoseraten (Mittelwert GSF 6.7%, Mittelwert FLI 7.8%) bei hohen Raten an spontaner Nekrose (Mittelwert GSF 72.4%, Mittelwert FLI 65.9%) aufwiesen. Im dritten Labor (UKM) wurden dagegen höhere Apoptoseraten (Mittelwert 22.1%) bei niedrigeren Raten spontaner Nekrose (Mittelwert 22.96%) bestimmt. Abb.II.5.1 zeigt den Vergleich zwischen den drei Laboren (Münster = UKM, München = GSF, Jena = FLI) im Hinblick auf die gemessenen Apoptoseraten nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen aufgetrennt nach sensitiven und nicht-sensitiven Patienten. Die dazugehörigen Werte sind in Tab.II.5.1 zusammengestellt.

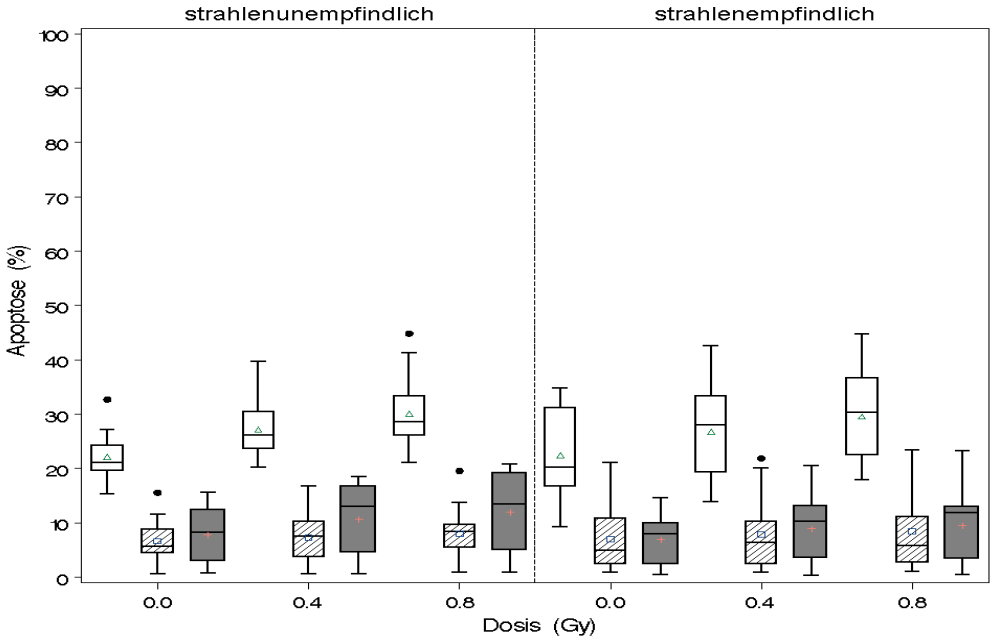


Abb. II.5.1: Vergleich der Apoptose-Messungen zwischen den 3 Laboren
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis: 0.0, 0.4 und 0.8 Gy. **Weiß:** UKM-Münster, **schraffiert:** GSF-München, **grau:** FLI-Jena. Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	Apoptose (%)	strahlenunempfindlich			strahlenempfindlich		
		Dosis (Gy)					
		0.0	0.4	0.8	0.0	0.4	0.8
UKM	Mittelwert	22.12	27.25	30.16	22.40	26.79	29.60
	Median	21.12	26.08	28.49	20.23	28.00	30.31
	Spannweite	17.51	19.45	23.82	25.51	28.68	26.80
	Minimum	15.24	20.25	21.07	9.19	13.90	17.87
	Maximum	32.75	39.70	44.88	34.69	42.58	44.67
GSF	Mittelwert	6.66	7.25	8.02	7.06	7.89	8.47
	Median	5.62	7.49	8.40	4.92	6.31	5.81
	Spannweite	15.10	16.22	18.70	20.26	21.10	22.40
	Minimum	0.50	0.50	0.90	0.82	0.80	1.00
	Maximum	15.60	16.72	19.60	21.08	21.90	23.40
FLI	Mittelwert	7.80	10.65	11.97	6.87	8.90	9.52
	Median	8.22	12.97	13.37	7.91	10.19	11.89
	Spannweite	14.76	17.92	19.98	14.14	20.14	22.79
	Minimum	0.74	0.53	0.83	0.39	0.29	0.36
	Maximum	15.50	18.45	20.80	14.53	20.44	23.15

Tab. II.5.1: Vergleich der Apoptose-Messungen innerhalb der einzelnen Labors
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors UKM-Münster, GSF-München, FLI-Jena.

Im Vergleich der Labors zeigte sich ein auf dem 0.01-Niveau hochsignifikanter Unterschied zwischen UKM vs. GSF und UKM vs. FLI für alle gemessenen Dosispunkte bei strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten. Lediglich im Vergleich GSF vs. FLI zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tab.II.5.2). Ein Vergleich der Resultate der strahlenunempfindlichen mit denen der strahlenempfindlichen Patienten erbrachte für kein Labor einen signifikanten Unterschied (Tab.II.5.3). Eine signifikante Dosisabhängigkeit der Apoptoserate konnte für das UKM (hochsignifikant in allen Vergleichen) und teilweise für das FLI (hochsignifikant bei den Strahlenunempfindlichen, teilweise signifikant bei den Strahlenempfindlichen) dokumentiert werden. Beim GSF zeigten sich nur einzelne Signifikanzen einer Dosisabhängigkeit der Apoptoserate (Tab.II.5.4).

Dosis (Gy)	Sensitivität	1 vs. 2 vs. 3[a]	1 vs. 2[b]	1 vs. 3[b]	2 vs. 3[b]
0.0	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.599
	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.890
0.4	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.169
	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.720
0.8	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.121
	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.561

Tab. II.5.2: Laborvergleich der Apoptose-Messungen
Gezeigt sind die p-Werte für die Laborvergleiche, getrennt nach Dosis und Sensitivität. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. **a:** Friedmann-Test; **b:** Wilcoxon-Test * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau. **1:** UKM-Münster; **2:** GSF-München; **3:** FLI-Jena

Labor	strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich[c]		
	Dosis (Gy)		
	0.0	0.4	0.8
UKM-Münster	0.8694	0.8372	0.9345
GSF-München	0.7424	0.6334	0.5939
FLI-Jena	0.6224	0.4136	0.2719

Tab. II.5.3: Vergleich der Apoptose strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich nach Labor und Dosis
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich nicht-sensitiv vs. sensitiv. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. **c:** Mann-Whitney-U-Test.

Dosisvergleich	Labor		
	UKM	GSF	FLI
strahlenunempfindlich			
0.0 vs. 0.4 vs. 0.8[a]	<0.001**	0.052	0.001**
0.0 vs. 0.4[b]	<0.001**	0.140	0.002**
0.0 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.031*	0.001**
0.4 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.064	0.012*
strahlenempfindlich			
0.0 vs. 0.4 vs. 0.8[a]	<0.001**	0.006**	0.330
0.0 vs. 0.4[b]	<0.001**	0.397	0.012*
0.0 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.005**	0.015*
0.4 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.078	0.252

Tab. II.5.4: Vergleich der Apoptose-Werte zu den unterschiedlichen Dosisintensitäten
Gezeigt sind die p-Werte für die Vergleiche zwischen Dosis 0.0, 0.4 und 0.8 Gy getrennt nach dem jeweiligen Labor. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. **a:** Friedmann-Test; **b:** Wilcoxon-Test * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau

Die gleichen Analysen wurden für die Ergebnisse der Nekroseraten durchgeführt. Die Abb.II.5.2 zeigt entsprechend den Vergleich zwischen den drei Labors (Münster = UKM, München = GSF, Jena = FLI) im Hinblick auf die gemessenen Nekroseraten nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen aufgetrennt nach strahlenempfindlichen und

strahlenunempfindlichen Patienten. Die dazugehörigen Werte sind in Tab.II.5.5 zusammengestellt.

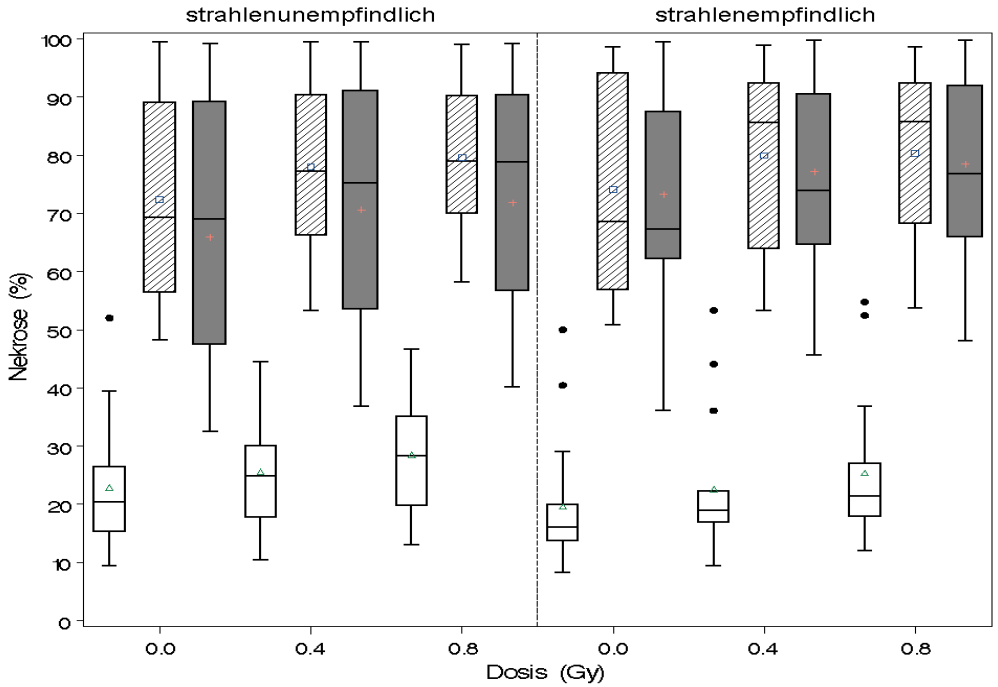


Abb. II.5.2: Vergleich der Nekrose-Messungen zwischen den 3 Laboren
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis: 0.0, 0.4 und 0.8 Gy. **Weiß:** UKM-Münster, **schraffiert:** GSF-München, **grau:** FLI-Jena. Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	Nekrose (%)	strahlenunempfindlich			strahlenempfindlich		
		Dosis (Gy)					
		0.0	0.4	0.8	0.0	0.4	0.8
UKM	Mittelwert	22.96	25.64	28.55	19.66	22.64	25.45
	Median	20.31	24.78	28.34	16.04	18.91	21.37
	Spannweite	42.62	34.07	33.68	41.78	43.93	42.78
	Minimum	9.42	10.42	12.99	8.24	9.44	12.03
	Maximum	52.04	44.49	46.66	50.02	53.37	54.81
GSF	Mittelwert	72.43	78.08	79.57	74.17	79.96	80.35
	Median	69.29	77.19	78.96	68.61	85.51	85.67
	Spannweite	51.21	46.10	40.79	47.70	45.49	44.93
	Minimum	48.19	53.30	58.22	50.80	53.31	53.67
	Maximum	99.40	99.40	99.00	98.50	98.80	98.60
FLI	Mittelwert	65.92	70.62	71.86	73.31	77.14	78.51
	Median	69.15	75.16	78.82	67.26	73.91	76.83
	Spannweite	66.71	62.69	59.09	63.45	54.01	51.56
	Minimum	32.45	36.78	40.08	36.02	45.64	48.07
	Maximum	99.15	99.47	99.17	99.47	99.65	99.63

Tab. II.5.5: Vergleich der Nekrose-Messungen innerhalb der einzelnen Labors
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors UKM-Münster, GSF-München, FLI-Jena.

In Analogie zu den Ergebnissen der Apoptoseraten zeigte sich im Vergleich der Labors ein auf dem 0.01-Niveau hochsignifikanter Unterschied zwischen UKM vs. GSF und UKM vs. FLI für alle gemessenen Dosispunkte bei strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten. Lediglich im Vergleich GSF vs. FLI zeigten sich erneut keine signifikanten Unterschiede (Tab.II.5.6). Auch für die gemessenen Nekroseraten erbrachte ein Vergleich der Resultate der strahlenunempfindlichen mit denen der strahlenempfindlichen Patienten für kein Labor einen signifikanten Unterschied (Tab.II.5.7). Anders als bei den Ergebnissen der Apoptoseraten konnte bei der Nekroserate eine hochsignifikante Dosisabhängigkeit für fast alle Messungen aller Labore gezeigt werden. Lediglich beim Vergleich der mit 0.4 vs. der mit 0.8 Gy bestrahlten Proben zeigte sich beim GSF und beim FLI kein hochsignifikantes Ergebnis (Tab.II.5.8).

Dosis (Gy)	Sensitivität	1 vs. 2 vs. 3[a]	1 vs. 2[b]	1 vs. 3[b]	2 vs. 3[b]
	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.454
0.0	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.804
	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.303
0.4	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.847
	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.330
0.8	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.978

Tab. II.5.6: Laborvergleich der Nekrose-Messungen
Gezeigt sind die p-Werte für die Laborvergleiche, getrennt nach Dosis und Sensitivität. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. a: Friedmann-Test; b: Wilcoxon-Test. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau. **1:** UKM-Münster; **2:** GSF München; **3:** FLI-Jena

Labor	strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich[c]		
	Dosis (Gy)		
	0.0	0.4	0.8
UKM-Münster	0.1948	0.2550	0.2087
GSF-München	0.8211	0.6814	0.8052
FLI-Jena	0.3909	0.3690	0.2897

Tab. II.5.7: Vergleich der Nekrose strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich nach Labor und Dosis
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. **c:** Mann-Whitney-U-Test.

Dosisvergleich	Labor		
	UKM	GSF	FLI
strahlenunempfindlich			
0.0 vs. 0.4 vs. 0.8[a]	<0.001**	<0.001**	0.004**
0.0 vs. 0.4[b]	<0.008**	0.001**	<0.001**
0.0 vs. 0.8[b]	<0.005**	0.002**	0.004**
0.4 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.100	0.121
strahlenempfindlich			
0.0 vs. 0.4 vs. 0.8[a]	<0.001**	<0.001**	<0.001**
0.0 vs. 0.4[b]	<0.001**	0.003**	<0.001**
0.0 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.003**	<0.001**
0.4 vs. 0.8[b]	<0.001**	0.074	0.012*

Tab. II.5.8: Vergleich der Nekrose-Werte zu den unterschiedlichen Dosisintensitäten
Gezeigt sind die p-Werte für die Vergleiche zwischen Dosis 0.0, 0.4 und 0.8 Gy getrennt nach dem jeweiligen Labor. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. **a:** Friedmann-Test; **b:** Wilcoxon-Test * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau.

Um den Zusammenhang zwischen den Labors zu bestimmen, wurden Rangkorrelationen nach Spearman berechnet (Tab.II.5.9). Exemplarisch sind die Korrelationen der Messungen zwischen UKM und GSF als Scatterplot in Abb.II.5.3 dargestellt.

Endpunkt Dosis (Gy)	1 vs. 2 r_{sp} (95%KI)	2 vs. 3 r_{sp} (95%KI)	1 vs. 3 r_{sp} (95%KI)
Apoptose			
0.0	0.50 [0.16;0.72]	0.28 [-0.01;0.53]	0.45 [0.10;0.70]
0.4	0.37 [0.00;0.64]	0.46 [0.19;0.66]	0.23 [-0.15;0.54]
0.8	0.25 [-0.13;0.55]	0.48 [0.21;0.67]	0.15 [-0.23;0.48]
Nekrose			
0.0	-0.07 [-0.42;0.30]	0.43 [0.15;0.64]	-0.23 [-0.54;0.14]
0.4	-0.14 [-0.47;0.24]	0.37 [0.09;0.60]	-0.24 [-0.55;0.14]
0.8	-0.14 [-0.48;0.23]	0.35 [0.06;0.58]	-0.26 [-0.57;0.11]
Lebend			
0.0	-0.16 [-0.49;0.22]	0.44 [0.16;0.64]	-0.20 [-0.52;0.18]
0.4	-0.08 [-0.43;0.29]	0.31 [0.01;0.55]	-0.04 [-0.39;0.33]
0.8	0.02 [-0.35;0.37]	0.29 [-0.01;0.53]	-0.03 [-0.38;0.34]
Tot			
0.0	-0.16 [-0.49;0.22]	0.44 [0.16;0.64]	-0.20 [-0.52;0.18]
0.4	-0.08 [-0.43;0.29]	0.31 [0.01;0.55]	-0.04 [-0.40;0.32]
0.8	0.02 [-0.34;0.38]	0.29 [-0.01;0.53]	-0.03 [-0.38;0.34]
Induzierte Apoptose			
0.4	0.19 [-0.19;0.51]	0.23 [-0.07;0.49]	0.47 [0.12;0.70]
0.8	0.32 [-0.05;0.61]	0.41 [0.13;0.63]	0.42 [0.07;0.68]
Induzierte Nekrose			
0.4	0.22 [-0.16;0.53]	0.28 [-0.02;0.53]	0.24 [-0.14;0.55]
0.8	0.29 [-0.09;0.58]	0.30 [0.01;0.54]	0.10 [-0.27;0.45]
Induzierte Tote Zellen			
0.4	0.21 [-0.16;0.53]	0.16 [-0.14;0.43]	0.30 [-0.07;0.60]
0.8	0.41 [0.06;0.67]	0.33 [0.03;0.56]	0.28 [-0.09;0.58]

Tab. II.5.9: Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman r_{sp}
1: UKM-Münster; **2:** GSF München; **3:** FLI-Jena. Zusätzlich Angabe des 95%-Konfidenzintervalls.

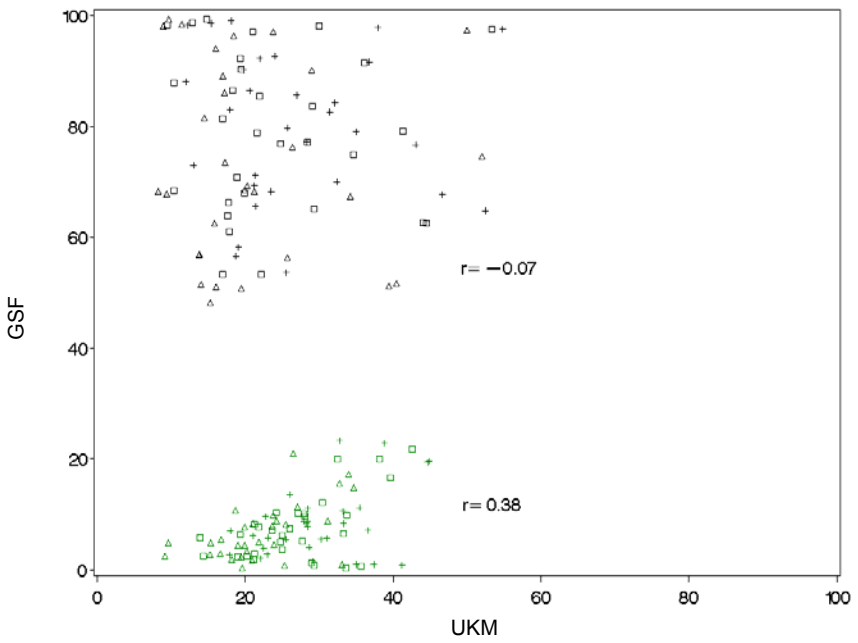


Abb. II.5.3: Scatterplot GSF-München vs. UKM-Münster
Korrelationen zwischen den beiden Labor-Messungen GSF-München und UKM-Münster.
Schwarz: Nekrose-Daten von 3 verschiedenen Bestrahlungsdosen sind dargestellt: Dreieck entspricht 0.0Gy, Quadrat zeigt 0.4Gy und Plus symbolisiert 0.8Gy. **Grün:** Apoptose-Daten analog. Der Spearman-Korrelationskoeffizient für die Nekrosewerte beträgt über alle 3 Strahlungsdosen -0.07 (95% KI -0.28 bis 0.14) und 0.38 für die Apoptosewerte (95% KI 0.19 bis 0.55).

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen zwei Labors wurde unter Anwendung der Methode nach Bland-Altman überprüft (Bland & Altman, 1986). Entsprechend dieses Verfahrens wurden die Differenzen der einzelnen Messungen zweier zu vergleichender Labore berechnet. Der Bereich von 2 Standardabweichungen über und unter der mittleren Differenz gilt als Maß für die Abweichung der beiden Messungen voneinander.

Es bestätigten sich sowohl für die Apoptose- als auch für die Nekrosedaten große systematische Unterschiede. Im Vergleich UKM vs. GSF zeigte die Bland-Altman-Statistik einen mittleren Bias von +18.8% für Apoptose und -53.3% für Nekrose, im Vergleich UKM vs. FLI einen mittleren Bias von +17.1% für Apoptose und -48.7% für Nekrose sowie im Vergleich GSF vs. FLI einen mittleren Bias von -1.7% für Apoptose und +4.5% für Nekrose (Tab.II.5.10).

	Nekrose			Apoptose		
Labor	**1 vs. 2**	**2 vs. 3**	**1 vs. 3**	**1 vs. 2**	**2 vs. 3**	**1 vs. 3**
Bias	-53.279	4.537	-48.742	18.828	-1.728	17.100

Tab. II.5.10: Bias (mittlere Differenz zwischen den jeweiligen Labors)
Dargestellt sind jeweils die mittleren Differenzen des jeweiligen Laborvergleichs getrennt nach Apoptose und Nekrose.
1: UKM-Münster; **2:** GSF-München; **3:** FLI-Jena

Diese systematischen Abweichungen werden auch im direkten Vergleich zwischen den jeweiligen Labormessungen in Bland-Altman-Plots deutlich. Exemplarisch für UKM vs. GSF in Abb.II.5.4 mit gemeinsamer Darstellung der Apoptose und Nekrosedaten und im Überblick für beide einzelnen Parameter in Abb.II.5.5. verdeutlicht. Dargestellt sind in Abb.II.5.5 auf der linken Seite jeweils die Nekrosedaten, auf der rechten Seite die Apoptosedaten. Die erste Reihe (Abb. II.5.5.a und Abb. II.5.5.b) zeigt den Vergleich UKM vs. GSF, die zweite Reihe (Abb. II.5.5.c und Abb.II.5.5.d) UKM vs. FLI und die dritte Reihe (Abb. II.5.5.e und Abb.II.5.5.f) den Vergleich GSF vs. FLI.

Die Apoptose- und Nekroseraten zeigten damit zwischen den einzelnen Laboren z.T. erhebliche Unterschiede. Alle Labore detektierten einzelne Zelltodwerte, die potentiell als Kandidaten für erhöhte Strahlenempfindlichkeit angesehen werden könnten. Allerdings wurden diese potentiellen Kandidaten von den anderen Laboren nicht bestätigt. Ein Hinweis auf signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit zwischen strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten ergab sich damit nicht.

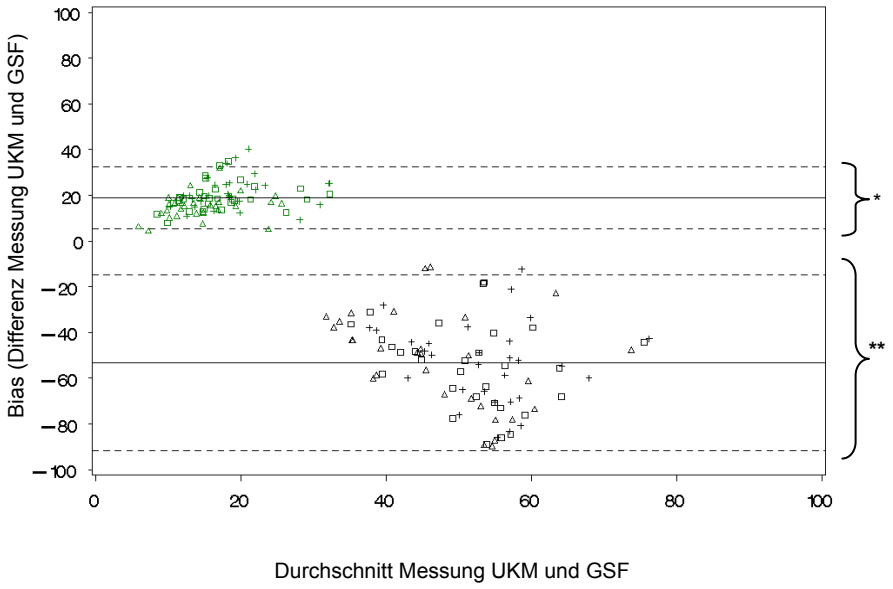


Abb. II.5.4: BLAND-ALTMAN-Plot GSF-München vs. UKM-Münster
Bland-Altman Analyse zwischen den beiden Messungen GSF und UKM.
Die durchgezogene Linie stellt jeweils die mittlere Differenz zwischen beiden Messungen dar. Die unterbrochenen Linien kennzeichnen die 2-fach positive bzw. negative doppelte Standardabweichung von der mittleren Differenz.
(*) Apoptose-Daten (**grün**) der jeweiligen Bestrahlungsdosen 0.0Gy (△), 0.4Gy (□) und 0.8Gy (+). Der mittlere Bias liegt bei 18.83 mit einer 1fachen Standardabweichung der Differenzen von 6.79.
(**) Nekrose-Daten analog (**schwarz**). Der mittlere Bias liegt bei -53.28 bei einer 1fachen Standardabweichung der Differenzen von 19.22

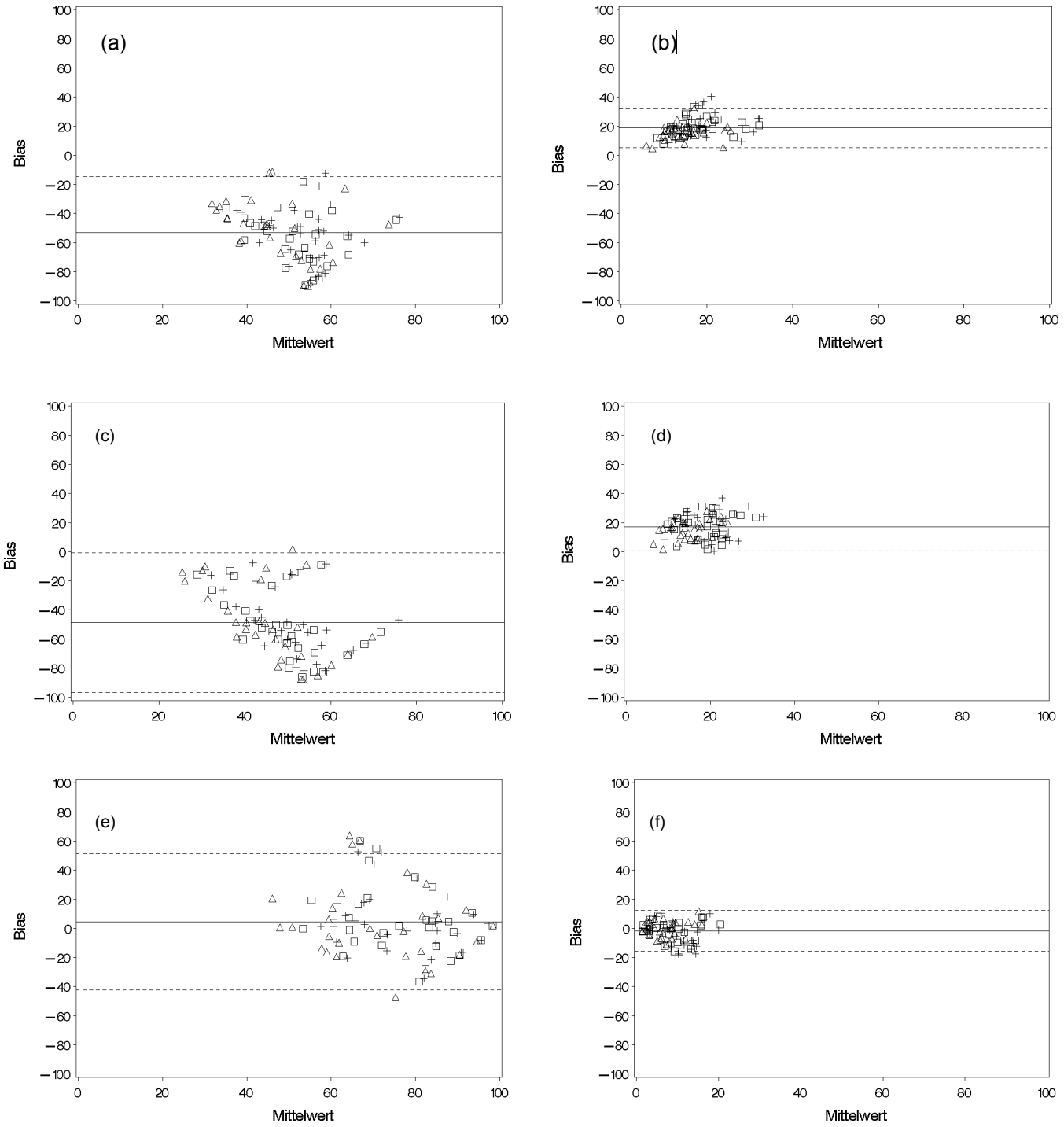


Abb. II.5.5: BLAND-ALTMAN-Plots separat für Apoptose und Nekrose im jeweiligen Laborvergleich
Bland-Altman Plots zu den verschiedenen Laboren. Die linke Spalte zeigt die Nekrosedaten (a, c und e). Die rechte Spalte zeigt die Apoptosedaten (b, d and f)
a, b: Ergebnisse des Laborvergleichs UKM-Münster vs. GSF-München innerhalb 3 verschiedener Bestrahlungsdosen. 0.0Gy (△), 0.4Gy (□) und 0.8Gy (+).
Die x-Koordinate beschreibt den Mittelwert aus beiden Messungen, die y-Achse repräsentiert die Differenz zwischen beiden Laboren für jedes Datenpaar.
Die durchgezogene Linie innerhalb der Graphik kennzeichnet die mittlere Differenz zwischen beiden Laboren. Die unterbrochenen Linien stellen die doppelte Standardabweichung dar.
c, d: Ergebnisse des Laborvergleichs UKM-Münster vs. FLI-Jena.
e, f: Ergebnisse des Laborvergleichs GSF-München vs. FLI-Jena.
Der Vergleich der Messungen beinhaltet das Kollektiv der 30 Patienten (15 Strahlenunempfindliche und 15 Strahlenempfindliche zu jeder Strahlungsdosis).

II.5.2. γH2AX

Die Analysen zu γH2AX wurden in den Laboren in Jena (FLI) und München (GSF) durchgeführt. Der Interlaborvergleich erfolgte nach dem gleichen Schema wie für die Apoptose-Charakterisierung. Abb.II.5.6 zeigt einen direkten Vergleich der Reparaturkinetiken der primären Lymphozyten für die verschiedenen Dosis-/Zeitpunkte getrennt nach strahlenunempfindlichen und strahlenempfindlichen Patienten. Die dazugehörigen Lage- und Streuungsmaße sind in Tab.II.5.11 aufgeführt.

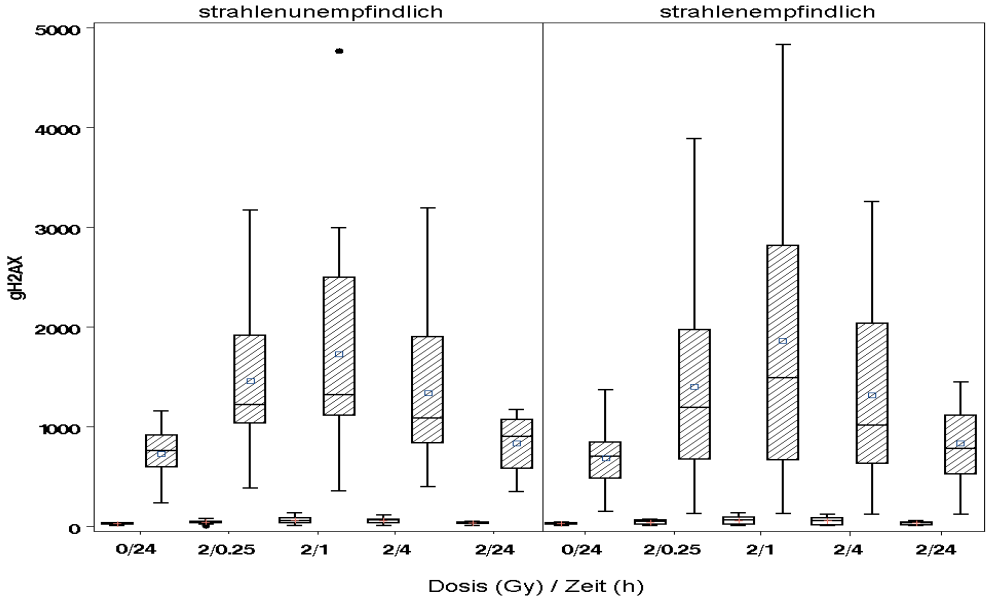


Abb. II.5.6: Vergleich der Histon H2AX-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors innerhalb der primären Lymphozyten
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** FLI-Jena, **schraffiert:** GSF-München.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

		strahlenunempfindlich					strahlenempfindlich				
		Dosis(Gy) / Zeit (h)									
Labor	gH2AX	0/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24	0/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24
GSF	Mittelwert	726.0	1459.4	1731.6	1340.6	836.9	690.0	1405.6	1862.2	1319.4	836.9
	Median	759.0	1224.0	1322.0	1088.0	904.0	706.0	1189.0	1491.0	1013.5	779.0
	Spannweite	924.0	2792.0	4410.0	2799.0	828.0	1222.0	3757.0	4704.0	3131.0	1327.0
	Minimum	235.0	382.0	358.0	396.0	346.0	149.0	127.0	128.0	123.0	122.0
	Maximum	1159.0	3174.0	4768.0	3195.0	1174.0	1371.0	3884.0	4832.0	3254.0	1449.0
FLI	Mittelwert	28.4	46.1	64.8	60.60	32.9	27.9	43.23	60.9	58.2	33.3
	Median	28.0	46.5	61.0	63.2	34.1	30.4	48.7	64.9	59.7	34.3
	Spannweite	28.0	66.7	124.9	105.5	36.8	33.2	59.8	124.1	113.7	44.1
	Minimum	11.4	9.4	9.1	9.5	10.5	11.2	9.8	9.9	9.3	10.4
	Maximum	39.4	76.1	134.0	115.0	47.3	44.4	69.6	134.0	123.0	54.5

Tab. II.5.11: Vergleich der Histon-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors für die primären Lymphozyten
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors FLI-Jena und GSF-München.

Im Vergleich zu einem geringen basalem Schadensniveau beim FLI (Mittelwert 28.4 bei 0/24, d.h. ohne strahleninduzierte DNA-Schädigung) waren beim GSF höhere Werte zu beobachten (Mittelwert 726.0 bei 0/24). Auch nach 2Gy Gammabestrahlung zeigten sich zu allen Zeiten durchweg höhere Messungen beim GSF.

Eine entsprechende Darstellung für die immortalisierten Zelllinien zeigen Abb.II.5.7 und Tab.II.5.12. Auch hier zeigen sich durchweg höhere Werte sowohl für das basale Schadensniveau beim GSF (Mittelwert 0/24 940.1) gegenüber FLI (Mittelwert 0/24 201.8), als auch zu allen Zeiten nach 2Gy Gammabestrahlung.

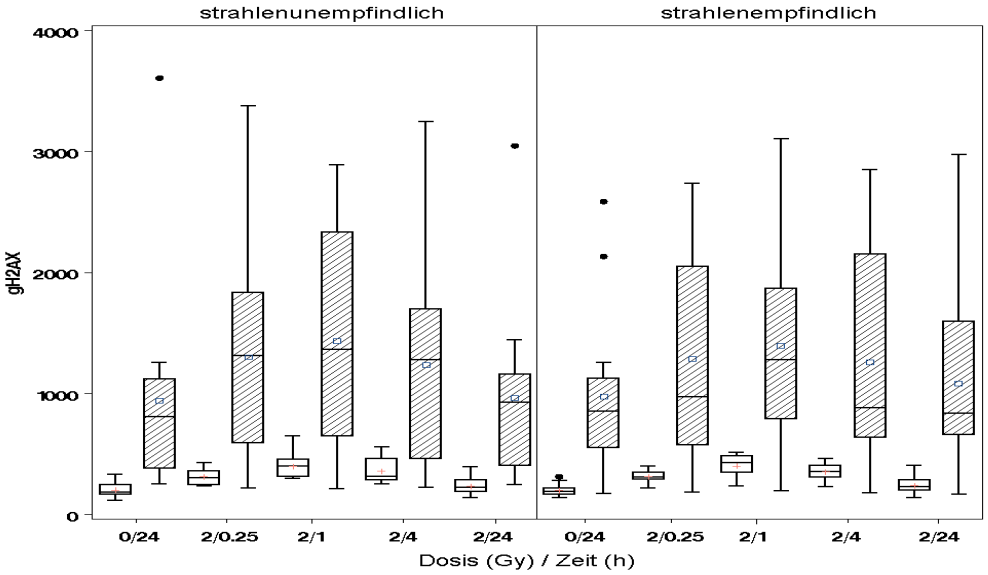


Abb. II.5.7: Vergleich der Histon H2AX-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors innerhalb der Zelllinien
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** FLI-Jena, **schraffiert:** GSF-München.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

		strahlenunempfindlich					strahlenempfindlich				
		Dosis(Gy) /Zeit (h)									
Labor	gH2AX	0/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24	0/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24
GSF	Mittelwert	940.1	1301.2	1434.9	1237.9	963.0	976.8	1285.8	1393.2	1257.4	1080.5
	Median	804.0	1313.0	1364.0	1279.5	924.0	853.0	968.0	1276.0	1257.4	837.0
	Spannweite	3359.0	3163.0	2679.0	3022.0	2803.0	2418.0	2549.0	2914.0	2667.0	2808.0
	Minimum	249.0	215.0	212.0	222.0	245.0	170.0	184.0	192.0	179.0	168.0
	Maximum	3608.0	3378.0	2891.0	3244.0	3048.0	2588.0	2733.0	3106.0	2846.0	2976.0
FLI	Mittelwert	201.8	310.3	395.9	356.1	232.9	199.1	313.9	399.9	351.7	238.1
	Median	184.0	303.0	396.0	312.0	220.0	187.0	309.0	424.0	351.0	225.0
	Spannweite	215.0	189.0	352.0	310.0	253.0	175.0	179.0	282.0	236.0	267.0
	Minimum	116.0	235.0	296.0	248.0	139.0	138.0	217.0	231.0	227.0	138.0
	Maximum	331.0	424.0	648.0	558.0	392.0	313.0	396.0	513.0	463.0	405.0

Tab. II.5.12: Vergleich der Histon-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors für die Zelllinien.
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors FLI-Jena und GSF-München.

Im Unterschied dazu sind bei den strahleninduzierten Werten (P_{xGy}/P_{0Gy}) geringere Unterschiede festzustellen. Abb.II.5.8 zeigt mit den dazugehörigen Kennzahlen in Tab.II.5.13a die Werte für die induzierten gH2AX-Werte der primären Lymphozyten (GSF Mittelwert 2/0.25 2.1 vs. FLI Mittelwert 2/0.25 1.6).

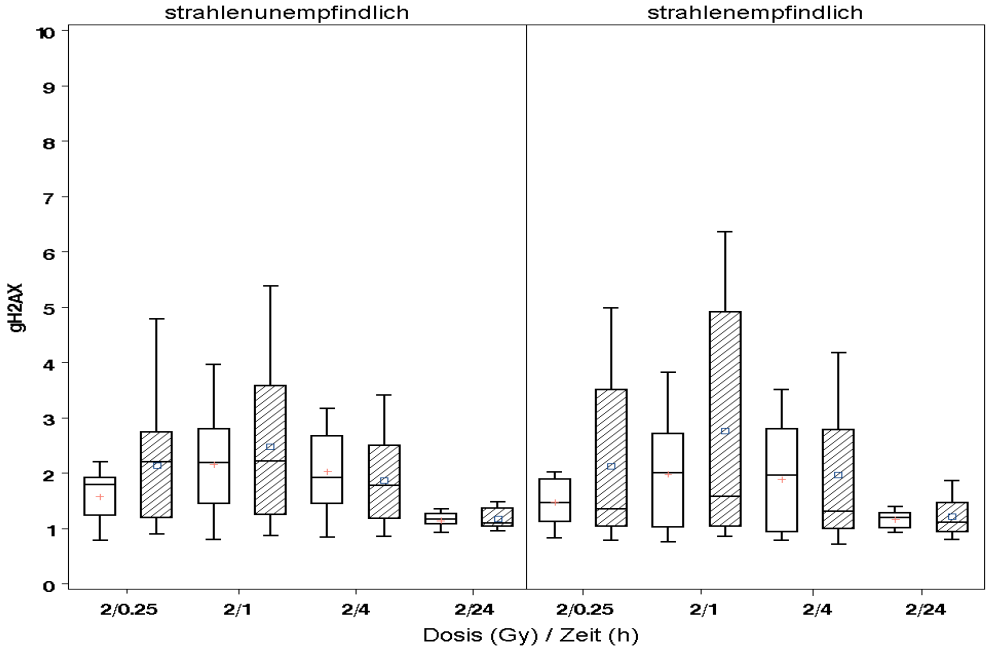


Abb. II.5.8: Vergleich der strahleninduzierten Histon H2AX-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors innerhalb der primären Lymphozyten
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** FLI-Jena, **schraffiert:** GSF-München.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	gH2AX	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis (Gy) / Zeit (h)							
		2/0.25	2/1	2/4	2/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24
GSF	Mittelwert	2.1	2.5	1.9	1.2	2.1	2.8	2.0	1.2
	Median	2.2	2.2	1.8	1.1	1.3	1.6	1.3	1.1
	Spannweite	3.9	4.5	2.6	0.5	4.2	5.5	3.5	1.1
	Minimum	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.7	0.8
	Maximum	4.8	5.4	3.4	1.5	5.0	6.4	4.2	1.9
FLI	Mittelwert	1.6	2.2	2.0	1.14	1.5	2.0	1.9	1.2
	Median	1.8	2.2	1.9	1.17	1.5	2.0	2.0	1.2
	Spannweite	1.4	3.2	2.3	0.4	1.2	3.1	2.7	0.5
	Minimum	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9
	Maximum	2.2	4.0	3.2	1.3	2.0	3.8	3.5	1.4

Tab. II.5.13a: Vergleich der strahleninduzierten Histon-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors für die primären Lymphozyten
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors FLI-Jena und GSF-München.

Die entsprechenden Ergebnisse für die Zelllinien sind in Abb.II.5.9 mit den dazugehörigen Kenngrößen in Tab.II.5.13b abgebildet (GSF Mittelwert 2/0.25 1.5 vs. FLI Mittelwert 2/0.25 1.6).

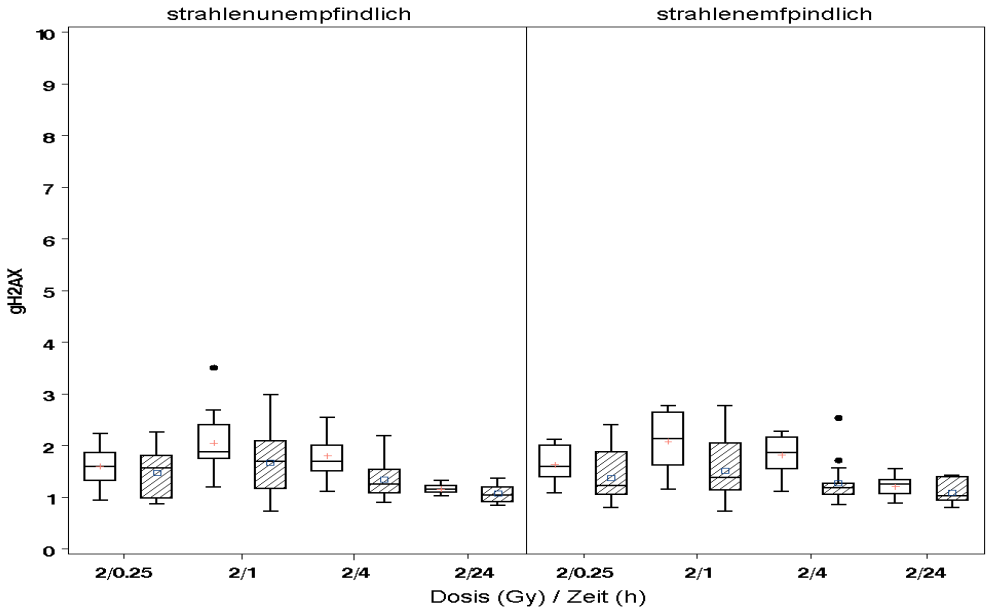


Abb. II.5.9: Vergleich der strahleninduzierten Histon H2AX-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors innerhalb der Zelllinien
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** FLI-Jena, **schraffiert:** GSF-München.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	gH2AX	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis(Gy) / Zeit (h)							
		2/0.25	2/1	2/4	2/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24
GSF	Mittelwert	1.5	1.7	1.3	1.1	1.4	1.5	1.3	1.1
	Median	1.6	1.7	1.3	1.0	1.2	1.4	1.2	1.0
	Spannweite	1.4	2.3	1.3	0.5	1.6	2.0	1.7	0.6
	Minimum	0.9	0.7	0.9	0.8	0.8	0.7	0.9	0.8
	Maximum	2.3	3.0	2.2	1.3	2.4	2.8	2.5	1.4
FLI	Mittelwert	1.6	2.0	1.8	1.2	1.6	2.1	1.8	1.2
	Median	1.6	1.9	1.7	1.1	1.6	2.1	1.9	1.3
	Spannweite	13	2.3	1.4	0.3	1.0	1.6	1.2	0.7
	Minimum	0.9	1.2	1.1	1.0	1.1	1.2	1.1	0.9
	Maximum	2.2	3.5	2.5	1.3	2.1	2.8	2.3	1.5

Tab. II.5.13b: Vergleich der strahleninduzierten Histon-Phosphorylierung zwischen den 2 Labors für die Zelllinien
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach Dosis und den jeweiligen Labors FLI-Jena und GSF-München.

Um die Stärke des Zusammenhangs zwischen beiden Labormessungen zu untersuchen, wurden erneut Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Die Ergebnisse sind jeweils über alle Zellen, den primären Lymphozyten, sowie den Zelllinien in Tab.II.5.14 zusammengestellt.

gH2AX	r_{sp}(95%KI) über alle Zellen[a] (N=90)	r_{sp}(95%KI) prim. Lymphozyten[b] (N=30)	r_{sp}(95%KI) Zelllinien[c] (N=30)
Rohwerte P_{xGy}			
0Gy / 24h *(basale Schadensniveau)*	0.20 [0.00;0.40]	0.33 [-0.04;0.62]	0.08 [-0.29;0.43]
2Gy / 0.25h	0.09 [-0.12;0.30]	0.16 [-0.22;0.49]	0.25 [-0.12;0.56]
2Gy / 1h	0.06 [-0.15;0.27]	0.07 [-0.30;0.42]	0.21 [-0.17;0.53]
2Gy / 4h	0.12 [-0.09;0.32]	0.10 [-0.28;0.45]	0.35 [-0.03;0.63]
2Gy / 24h	0.16 [-0.05;0.35]	0.33 [-0.04;0.62]	0.23 [-0.15;0.54]
strahleninduziert (P_{xGy}/P_{0Gy})			
2Gy / 0.25h	0.23 [0.02;0.41]	0.28 [-0.09;0.58]	0.27 [-0.10;0.57]
2Gy / 1h	0.16 [-0.05;0.36]	0.11 [-0.26;0.45]	0.22 [-0.16;0.53]
2Gy / 4h	0.23 [0.02;0.42]	0.17 [-0.21;0.50]	0.34 [-0.03;0.63]
2Gy / 24h	0.16 [-0.05;0.36]	0.39 [0.03;0,65]	0.47 [0.13;0.71]

Tab. II.5.14: Rangkorrelationen nach Spearman unter zusätzlicher Angabe des 95% Konfidenzintervalls.
a: gesamte Zellen: strahlenunempfindlich (30), strahlenempfindlich (30), laborinterne Kontrollen (15), KORA (15)
b: primäre Lymphozyten: strahlenunempfindlich (15), strahlenempfindlich (15)
c: Zelllinien: strahlenunempfindlich (15), strahlenempfindlich (15)

Wie aus der Tabelle II.5.15 ersichtlich wird, zeigten sich hoch signifikante Unterschiede beim Vergleich beider Labors bei den Rohwerten (sowohl für die primären Lymphozyten als auch für die Zelllinien), wohingegen die strahleninduzierten Werte bei den primären Lymphozyten nur für eine Messung und bei den Zelllinien für vier Messungen signifikante Unterschiede ergaben (Tab. II.5.16).

Sensitivität	Status	0Gy/24h	2Gy/0.25h	2Gy/1h	2Gy/4h	2Gy/24h
strahlenunempfindlich	**prim. Lymph.**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
strahlenempfindlich		<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
strahlenunempfindlich	**Zelllinien**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**	<0.001**
strahlenempfindlich		<0.001**	<0.001**	<0.001**	0.001**	<0.001**

Tab. II.5.15: Vergleich GSF-München vs. FLI-Jena bzgl. der Rohwerte P_{xGy}
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich München vs. Jena.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Wilcoxon-Test)

Sensitivität	Status	2Gy/0.25h	2Gy/1h	2Gy/4h	2Gy/24h
strahlenunempfindlich	prim. Lymph.	0.030*	0.489	0.489	0.599
strahlenempfindlich		0.277	0.229	0.426	0.599
strahlenunempfindlich	Zelllinien	0.303	0.151	0.007**	0.107
strahlenempfindlich		0.022*	0.002**	0.001**	0.095

Tab. II.5.16: Vergleich GSF-München vs. FLI-Jena bzgl. der strahleninduzierten Werte P_{xGy}/P_{0Gy}
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich München vs. Jena.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Wilcoxon-Test)

Ähnlich wie bei den Ergebnissen der Apoptose ergab sich auch für gammaH2AX kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Ergebnisse im Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit zwischen strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten (Tab.II.5.17). Ein bis auf einen Wert hochsignifikanter dosisabhängiger Anstieg konnte dabei jedoch in beiden Laboren für alle Dosis-/Zeitpunkte sowohl bei den Rohwerten als auch strahleninduziert dokumentiert werden (Tab. II.5.18).

Labor	Status	strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich								
		Rohwerte (p-values)					Strahleninduziert (p-values)			
		0/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24	2/0.25	2/1	2/4	2/24
GSF-München	prim. Lymph.	0.560	0.683	1.000	0.780	1.000	0.539	1.000	0.847	0.902
FLI-Jena		0.879	0.935	0.815	0.767	0.967	0.512	0.683	0.713	0.713
GSF-München	Zelllinien	0.838	0.806	0.935	0.983	0.838	0.595	0.436	0.621	0.838
FLI-Jena		0.927	0.691	0.588	0.574	0.766	0.870	0.902	0.775	0.461

Tab. II.5.17: Vergleich strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Mann-Whitney-U-Test)

Dosis(Gy)/Zeit(h)	Status		Rohwerte (p-values) 0/24 vs. 2/0.25 vs. 2/1 vs. 2/4 vs. 2/24	Strahleninduziert (p-values) 2/0.25 vs. 2/1 vs. 2/4 vs. 2/24
GSF-München	Prim. Lymph.	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**
FLI-Jena	Prim. Lymph.	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**
GSF-München	Zelllinien	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**
FLI-Jena	Zelllinien	strahlenunempfindlich	<0.001**	<0.001**
GSF-München	Prim. Lymph.	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**
FLI-Jena	Prim. Lymph.	strahlenempfindlich	0.004**	0.038*
GSF-München	Zelllinien	strahlenempfindlich	<0.001**	0.002**
FLI-Jena	Zelllinien	strahlenempfindlich	<0.001**	<0.001**

Tab. II.5.18: Vergleich über die einzelnen Bestrahlungszeitpunkte
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich der Zeiten nach Bestrahlung.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Friedmann-Test)

In der Bland-Altmann-Analyse zeigte sich im Vergleich GSF vs. FLI ein mittlerer Bias von +1174,9 bei den primären Lymphozyten und von +887,85 bei den immortalisierten Zelllinien für die Rohwerte P_{xGy} bzw. von +0,3059 bei den primären Lymphozyten und von -0,3050 bei den immortalisierten Zelllinien für die strahleninduzierten Werte P_{xGy}/P_{0Gy}) (Tab. II.5.19). Ein direkter Vergleich in Form von Bland-Altman-Plots zeigt Abbildung II.5.10. Die obere Reihe zeigt die Ergebnisse für die primären Lymphozyten, die untere die Ergebnisse für die immortalisierten Zelllinien (linke Spalte: Rohwerte, rechte Spalte: strahleninduziert).

GSF-München vs. FLI-Jena	Rohwerte		Strahleninduziert	
	primäre Lymphozyten	Zelllinien	primäre Lymphozyten	Zelllinien
Bias	1174.91	887.85	0.3059	-0.3050

Tab. II.5.19: Bias (mittlere Differenz der Messwerte zwischen GSF-München und FLI-Jena
Gezeigt sind die Bias-Werte getrennt nach den Rohwerten (PxGy) über alle Dosis-/Zeitpunkte und den strahleninduzierten Werten zusätzlich zum basalen Phosphorylierungsniveau (PxGy/P0Gy).

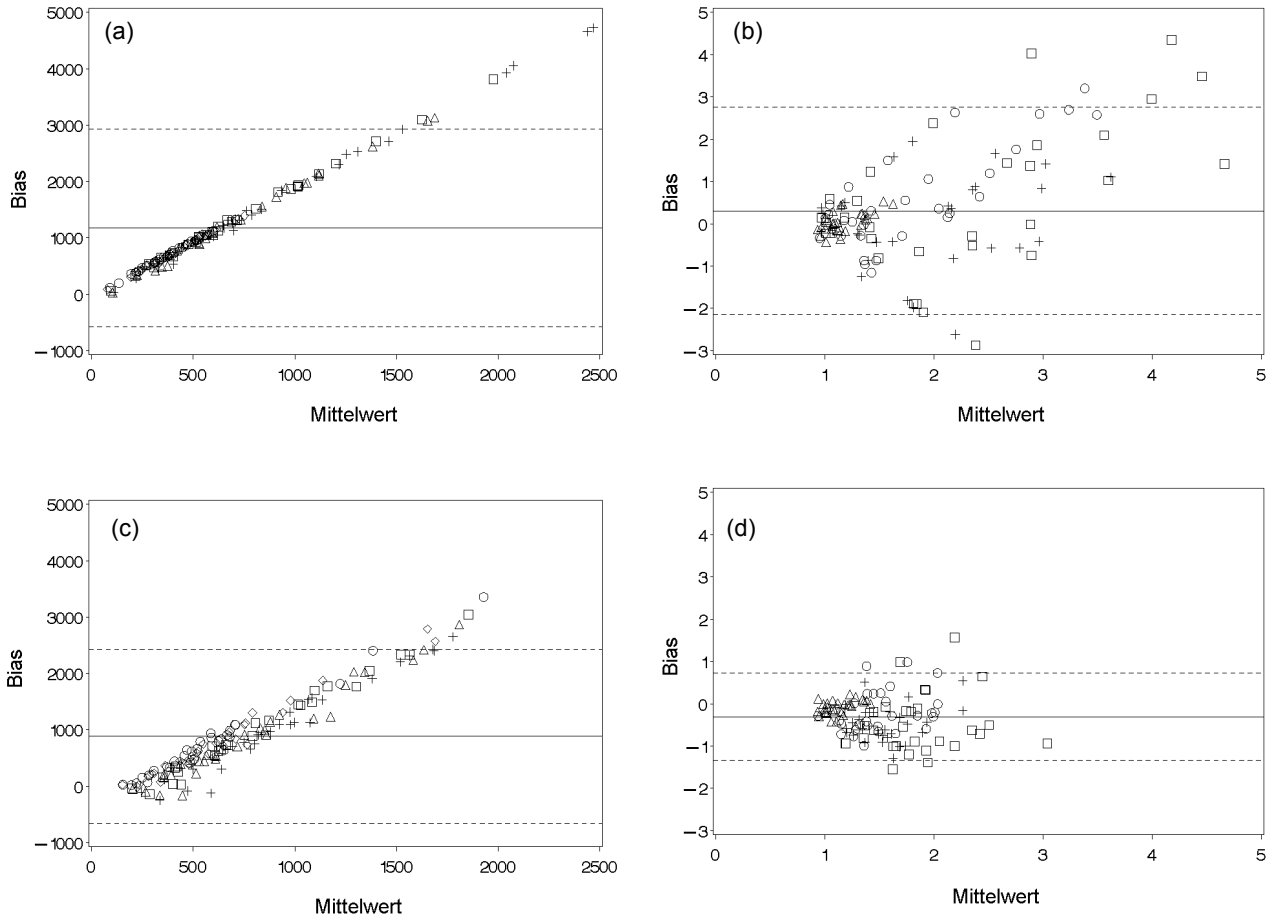


Abb. II.5.10: BLAND-ALTMAN-Plots separat für die Rohwerte und die strahleninduzierten Messungen im Laborvergleich zwischen GSF-München und FLI-Jena.
Ergebnisse des Laborvergleichs UKM-Münster vs. GSF-München innerhalb unterschiedlicher Bestrahlungsdosen
a, c: Rohwerte (PxGy). Die Symbole repäsentieren: 0.0Gy-24h (O), 2Gy - 0.25h (□), 2Gy- 1h (+), 2Gy - 4h (△) und 2Gy - 24h (◊).
Im Einzelnen entspricht Plot (a) den primären Lymphozyten und Plot (c) den Zelllinien.
b, d: strahleninduzierte Messungen (PxGy/P0Gy). Die Symbole kennzeichnen: 2Gy-0.25h (O), 2Gy-1h (□), 2Gy-4h (+), 2Gy-24h (△).
Im Einzelnen entspricht Plot (b) den strahleninduzierten primären Lymphozyten und (d) den strahleninduzierten Zelllinien.
Der Vergleich der Messungen beinhaltet für jeden Plot das Kollektiv der 30 Patienten (15 Strahlenunempfindliche und 15 Strahlenempfindliche zu jeder Strahlungsdosis).
Die x-Koordinate beschreibt den Mittelwert aus beiden Messungen, die y-Achse repräsentiert die Differenz zwischen beiden Laboren GSF-München - FLI-Jena für jedes Datenpaar.
Die durchgezogene Linie innerhalb der Graphik kennzeichnet die mittlere Differenz zwischen beiden Laboren. Die unterbrochenen Linien stellen die doppelte Standardabweichung dar.

II.5.3. Comet Assay

Die Analysen zum Comet Assay wurden in den Laboren in Heidelberg (DKFZ) und München (BfS) durchgeführt. Der Interlaborvergleich erfolgte nach dem gleichen Schema wie für die Apoptose-und die gammaH2AX-Charakterisierung getrennt nach „OTM“ und „Tail DNA (%)“.

II.5.3.1 Olive Tail Moment (OTM)

Abb.II.5.11 zeigt die OTM-Ergebnisse der primären Lymphozyten getrennt nach Dosis-/Zeitpunkten für die beiden Labore aufgeteilt nach strahlenunempfindlichen und strahlenempfindlichen Patienten. Die dazugehörigen Lage- und Streuungsmaße sind in Tab. II.5.20 zusammengefasst. Sowohl für die strahlenunempfindlichen als auch für die strahlenempfindlichen Patienten zeigt sich ein Anstieg zum Zeitpunkt 0 Minuten nach Bestrahlung mit 5 Gy. Die anderen Werte sind jeweils geringer.

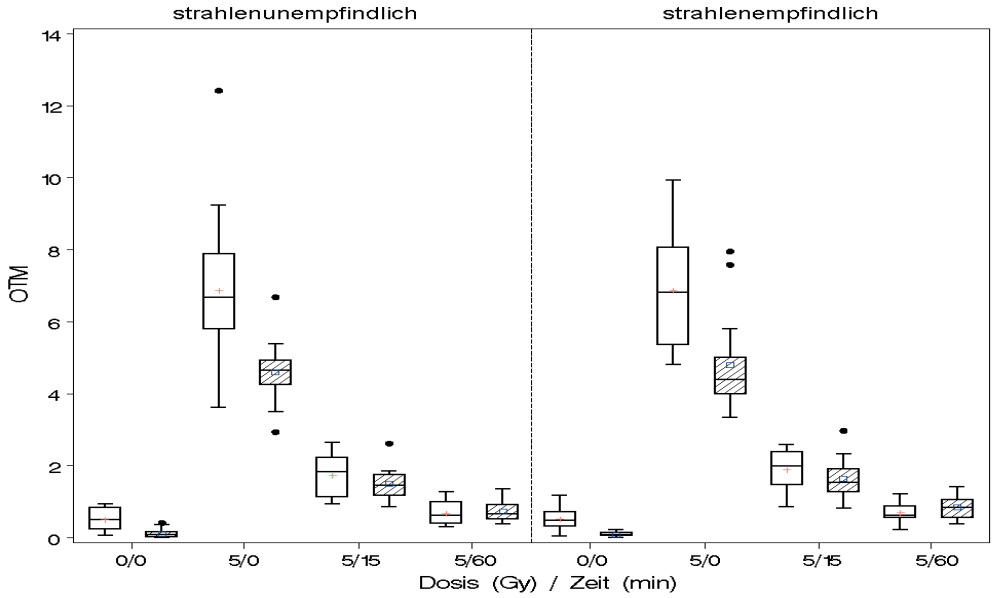


Abb. II.5.11: Vergleich der OTM-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der primären Lymphozyten
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte.
Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	OTM	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis (Gy) / Zeit (min)							
		0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	0.50	6.86	1.72	0.68	0.52	6.87	1.89	0.70
	Median	0.49	6.67	1.83	0.62	0.48	6.82	1.99	0.62
	Spannweite	0.87	8.81	1.70	0.96	1.14	5.11	1.74	0.99
	Minimum	0.06	3.61	0.94	0.31	0.04	4.81	0.85	0.21
	Maximum	0.93	12.42	2.63	1.27	1.18	9.93	2.59	1.20
DKFZ	Mittelwert	0.11	4.61	1.50	0.73	0.09	4.80	1.64	0.85
	Median	0.08	4.65	1.46	0.65	0.08	4.39	1.52	0.84
	Spannweite	0.42	3.75	1.76	0.98	0.22	4.61	2.15	1.04
	Minimum	0.00	2.94	0.86	0.38	0.00	3.34	0.82	0.37
	Maximum	0.42	6.69	2.62	1.35	0.22	7.96	2.98	1.42

Tab II.5.20: Vergleich der Messungen für Olive Tail Moment zwischen den Labors (primäre Lymphozyten)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

Ein gleiches Bild zeigt sich bei den immortalisierten Zelllinien, die aus den korrespondierenden primären Lymphozyten gewonnen wurden (Abb.II.5.12) sowie für die KORA-Zelllinien von gematchten Normalpersonen (Abb. II.5.13). Die dazugehörigen Kennzahlen stellen in Analogie zu Tabelle II.5.20 die Tab.II.5.21 für die Zelllinien sowie Tab.II.5.22 für die KORA-Zelllinien dar.

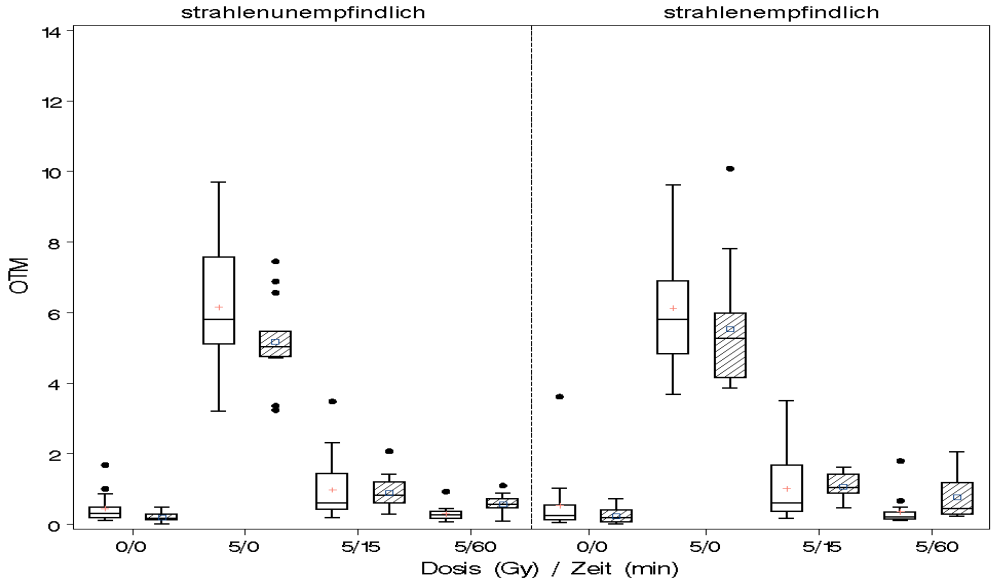


Abb. II.5.12: Vergleich der OTM-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der Zelllinien
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. Weiß: BfS-München, schraffiert: DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	OTM	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis (Gy) / Zeit (min)							
		0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	0.45	6.15	0.98	0.29	0.54	6.12	1.02	0.36
	Median	0.31	5.79	0.59	0.25	0.23	5.81	0.60	0.21
	Spannweite	1.58	6.49	3.30	0.87	3.59	5.93	3.35	1.71
	Minimum	0.11	3.20	0.19	0.06	0.04	3.68	0.16	0.09
	Maximum	1.68	9.69	3.49	0.93	3.62	9.61	3.51	1.80
DKFZ	Mittelwert	0.19	5.19	0.90	0.57	0.24	5.54	1.08	0.76
	Median	0.16	5.02	0.81	0.57	0.18	5.26	1.03	044
	Spannweite	0.47	4.21	1.80	1.01	0.71	6.23	1.15	1.82
	Minimum	0.00	3.24	0.27	0.09	0.00	3.86	0.47	0.22
	Maximum	0.47	7.46	2.08	1.10	0.71	10.09	1.62	2.04

Tab II.5.21: Vergleich der Messungen für Olive Tail Moment zwischen den Labors (Zelllinien)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

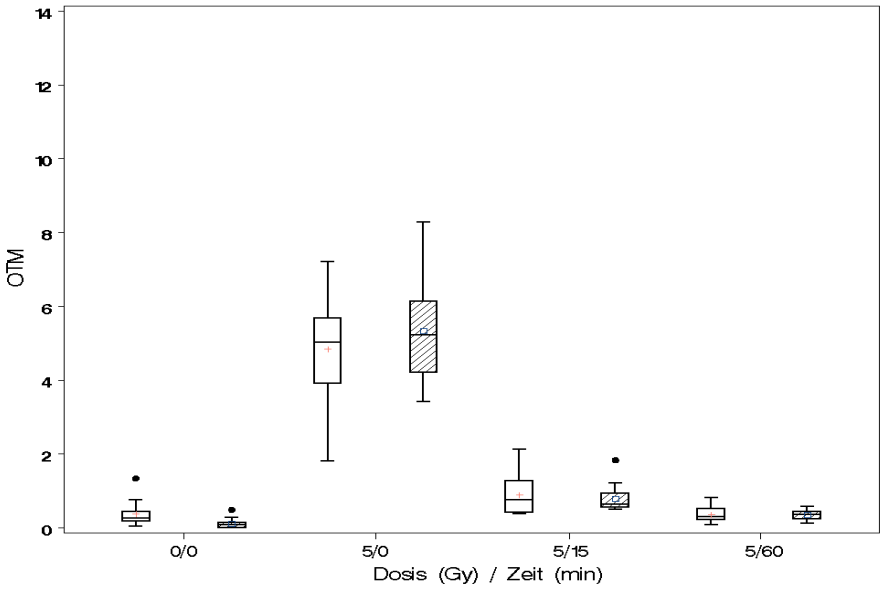


Abb. II.5.13: Vergleich der OTM-Messungen zwischen den 2 Laboren innerhalb der KORA-Zellen
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg. Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	OTM	Dosis (Gy) / Zeit (min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	0.37	4.85	0.90	0.36
	Median	0.26	5.03	0.75	0.31
	Spannweite	1.31	5.40	1.75	0.74
	Minimum	0.04	1,80	0.37	0.07
	Maximum	1.34	7.21	2.13	0.81
DKFZ	Mittelwert	0.11	5.34	0.80	0.35
	Median	0.09	5.23	0.64	0.36
	Spannweite	0.49	4.86	1.33	0.46
	Minimum	0.00	3.42	0.50	0.11
	Maximum	0.49	8.28	1.84	0.57

Tab II.5.22: Vergleich der Messungen für Olive Tail Moment zwischen den Labors (KORA-Zellen)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

In gleicher Weise zeigt sich ein ähnliches Ergebnis für die laborinterne Standardkontrolle Nr.1 aus der KORA-Gruppe (Abb.II.5.14 und Tab.II.5.23).

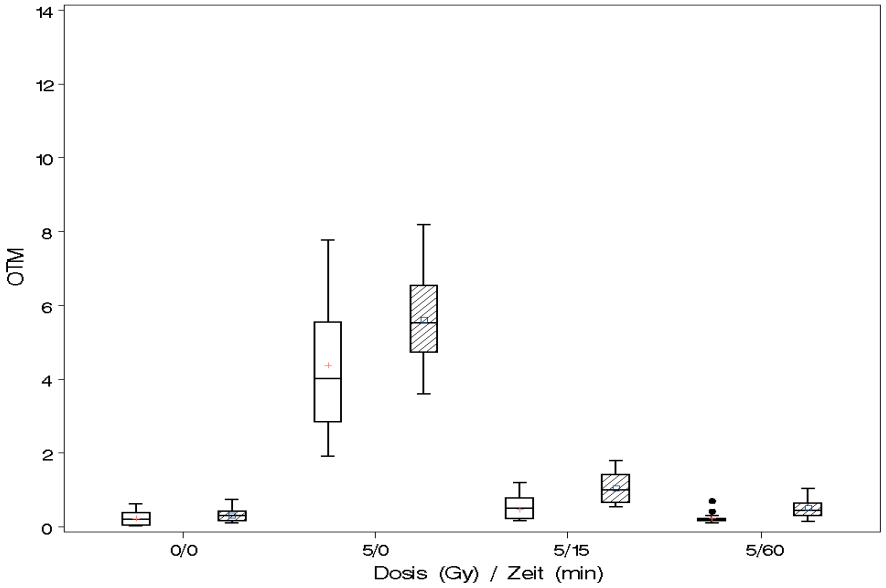


Abb. II.5.14: Vergleich der OTM-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der KORA-Zellen
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg. Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	OTM	Dosis (Gy) / Zeit (min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	0.23	4.38	0.48	0.24
	Median	0.21	4.01	0.49	0.20
	Spannweite	0.59	5.85	1.04	0.61
	Minimum	0.02	1.91	0.16	0.09
	Maximum	0.61	7.76	1.20	0.70
DKFZ	Mittelwert	0.32	5.61	1.05	0.51
	Median	0.30	5.52	1.00	0.44
	Spannweite	0.64	4.58	1.25	0.90
	Minimum	0.10	3.60	0.53	0.14
	Maximum	0.74	8.18	1.79	1.04

Tab II.5.23: Vergleich der Messungen für Olive Tail Moment zwischen den Labors (laborinterne Kontrolle)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

Die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten aufgeteilt nach den jeweiligen Zellen und Dosis-/Zeitpunkten sind in Tab.II.5.24 zusammengefasst. Hier zeigen sich durchgehend geringe Korrelationen, die auf einen schwachen Zusammenhang beider Messungen hindeuten.

Zellstatus Dosis(Gy)/Zeit(min)	BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg rsp (95%KI)
primäre Lymphozyten	
0/0	0.186 [-0.190;0.509]
5/0	0.166 [-0.209;0.495]
5/15	0.252 [-0.124;0.558]
5/60	0.167 [-0.209;0.495]
Zelllinien	
0/0	0.100 [-0.272;0.443]
5/0	0.108 [-0.265;0.449]
5/15	0.224 [-0.152;0.538]
5/60	0.229 [-0.147;0.542]
KORA-Zellen	
0/0	0.004 [-0.510;0.515]
5/0	-0.125 [-0.596;0.417]
5/15	0.104 [-0.435;0.582]
5/60	-0.129 [-0.598;0.415]
laborinterne Kontrolle	
0/0	-0.245 [-0.668;0.314]
5/0	-0.011 [-0.520;0.505]
5/15	0.095 [-0.442;0.577]
5/60	0.141 [-0.404;0.606]

Tab. II.5.24: Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman rsp
Zusätzlich Angabe des 95%-Konfidenzintervalls.

Im Detail verweist die Tabelle II.5.25 auf die Signifikanzberechnungen für die zu vergleichenden Messwerte beider Labors innerhalb der einzelnen Zelltypen und Dosis-/Zeitpunkte in Abhängigkeit von strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten. Hochsignifikante Unterschiede zeigten sich dabei vor allem bei den primären Zellen für die Messwerte 0Gy/0min und 5Gy/0min sowie für die laborinterne Kontrolle in den Gruppen 5Gy/15min und 5Gy/60min.

Sensitivität	Status	0Gy/0min	5Gy/0min	5Gy/15min	5Gy/60min
strahlenunempfindlich	primäre Lymphozyten	<0.001**	0.005**	0.188	0.524
strahlenempfindlich		<0.001**	<0.001**	0.208	0.095
strahlenunempfindlich	Zelllinien	0.041*	0.169	1.000	<0.001**
strahlenempfindlich		0.169	0.229	0.489	0.022*
	KORA-Zellen	0.005*	0.389	0.890	0.762
	laborinterne Kontrolle	0.303	0.064	0.001**	0.001**

Tab. II.5.25: Vergleich BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich München vs. Heidelberg.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Wilcoxon-Test)

Der Vergleich der Werte der strahlenunempfindlichen mit denen der strahlenempfindlichen Patienten erbrachte erneut, wie auch bei den Apoptose- und gammaH2AX-Bestimmungen, keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tab. II.5.26). Eine hochsignifikante Dosis-Wirkungsbeziehung konnte jedoch in beiden Laboren für alle Proben nachgewiesen werden (Tab. II.5.27).

Labor	Status	strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich			
		Dosis(Gy)/Zeit(min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS-München	Primäre Lymphozyten	0.902	0.838	0.436	0.683
DKFZ-Heidelberg		0.975	0.713	0.624	0.285
BfS-München	Zelllinien	0.595	0.870	1.000	0.838
DKFZ-Heidelberg		0.775	0.713	0.202	0.838

Tab. II.5.26: Vergleich der Nekrose strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich nach Labor und Dosis
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test).

Labor	Status		Dosis (Gy)/Zeit(min) 0/0 vs. 5/0 vs. 5/15 vs. 5/60
BfS-München	Primäre Lymphozyten	strahlen-unempfindlich	<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Primäre Lymphozyten	strahlen-empfindlich	<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	KORA-Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Laborinterne Kontrolle		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**

Tab. II.5.27: Vergleich über die einzelnen Bestrahlungszeitpunkte
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich der Zeiten nach Bestrahlung.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Friedmann-Test)

Im Vergleich BfS vs. DKFZ zeigte die Bland-Altman-Statistik für OTM einen mittleren Bias von +0.6774 für die primären Lymphozyten, 0.1822 für die Zellinien, -0.0306 für die KORA-Zellen und -0.5404 innerhalb der laborinternen Kontrolle (Tab.II.5.28).
Eine Übersicht in Bland-Altmann-Plots zeigt Abb.II.5.15 (a: primäre Lymphozyten, b: immortalisierte Zelllinien, c: KORA-Zellen, d: laborinterne Kontrolle).

BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg	primäre Lymphozyten	Zelllinien	KORA-Zelllinien	laborinterne Kontrolle
Bias	0.6774	0.1822	-0.0306	-0.5404

Tab. II.5.28: Bias (mittlere Differenz der Messwerte zwischen BfS-München und DKFZ-Heidelberg
Gezeigt sind die Bias-Werte (mittlere Differenz: BfS-DKFZ) getrennt nach den Zelltypen über alle Dosis-/Zeitpunkte.

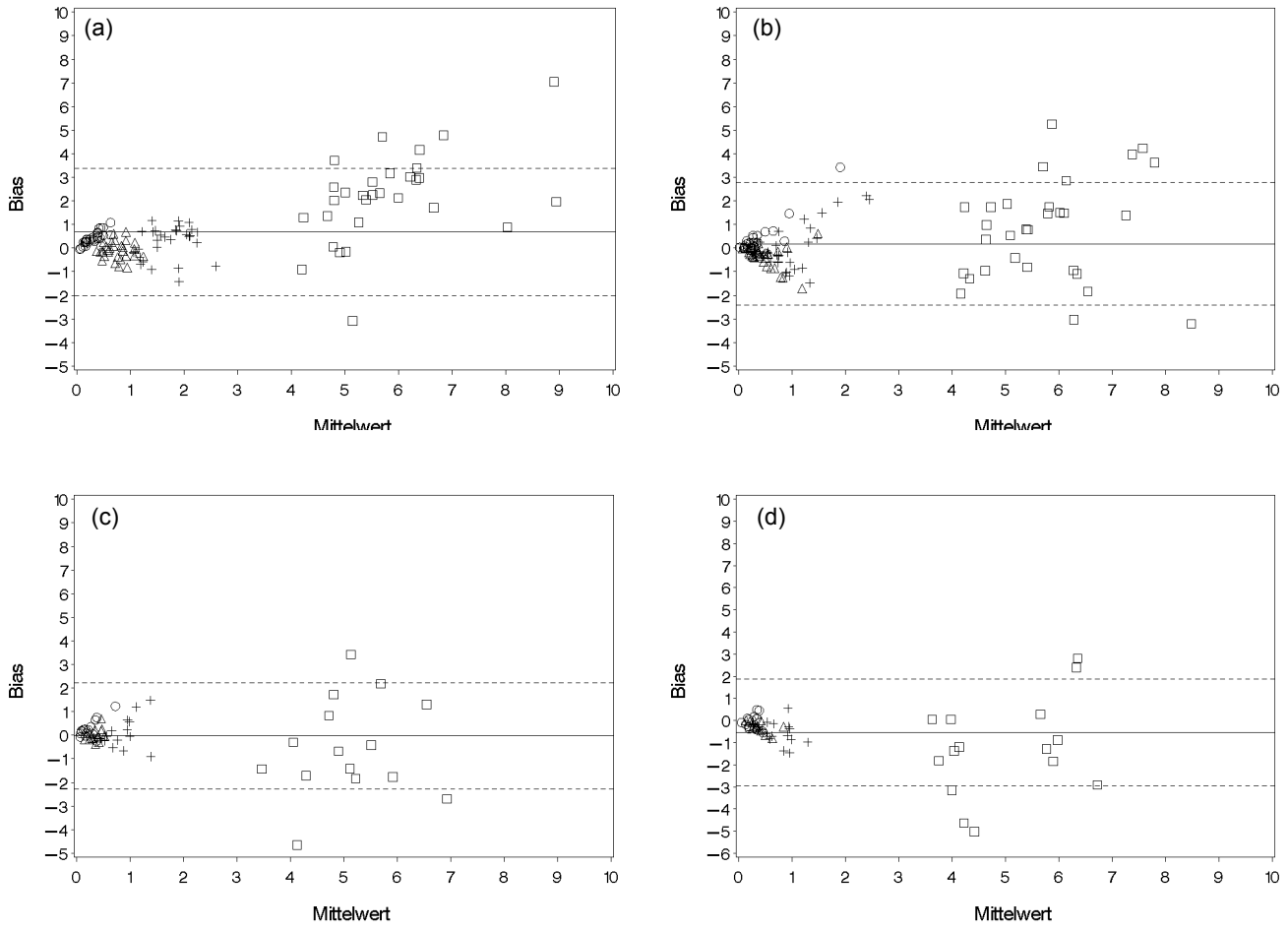


Abb.II.5.15: Bland-Altman-Plots zum Vergleich der Messungen zu Olive Tail Moment zwischen BfS-München und DKFZ-Heidelberg für die primären Lymphozyten **(a)**, Zelllinien **(b)**, KORA-Zellen **(c)** und laborinterner Kontrolle **(d)** innerhalb 4 verschiedener Dosis/Zeit-Endpunkte: 0Gy-0min (○), 5Gy-0min (□), 5Gy-15min (+), 5Gy-60min (△)
Die x-Koordinate beschreibt den Mittelwert, die y-Achse zeigt die Differenz zwischen beiden Labormessungen für jedes Datenpaar (Differenz BfS – DKFZ)
Die durchgezogene Linie in der Graphik kennzeichnet die mittlere Differenz zwischen beiden Labors. Die gestrichelten Linien sind jeweils die +/- 2-fache Standardabweichung von der mittleren Differenz.
Das Datenkollektiv der primären Lymphozyten und Zelllinien besteht jeweils aus 30 Patienten (15 strahlenempfindlich und 15 strahlenunempfindlich) für jeden Dosis/Zeit-Endpunkt.
Das Datenkollektiv der KORA-Zelllinien und der laborinternen Kontrolle besteht aus jeweils 15 Proben für jeden Dosis/Zeit-Endpunkt.

II.5.3.2 Tail DNA (%)

Die Auswertung für die „Tail DNA (%)“ erfolgte in Analogie zur Auswertung der „OTM“.

Abb.II.5.16 zeigt die Ergebnisse der primären Lymphozyten getrennt nach Dosis-/Zeitpunkten für die beiden Labore aufgeteilt nach strahlenunempfindlichen und strahlenempfindlichen Patienten. Die dazugehörigen Kenngrößen sind in Tab.II.5.29 zusammengefasst. Wie auch bei den OTM-Ergebnissen zeigt sich sowohl für die strahlenunempfindlichen als auch für die strahlenempfindlichen Patienten ein Anstieg zum Zeitpunkt 0 Minuten nach Bestrahlung mit 5 Gy. Die anderen Werte sind jeweils geringer.

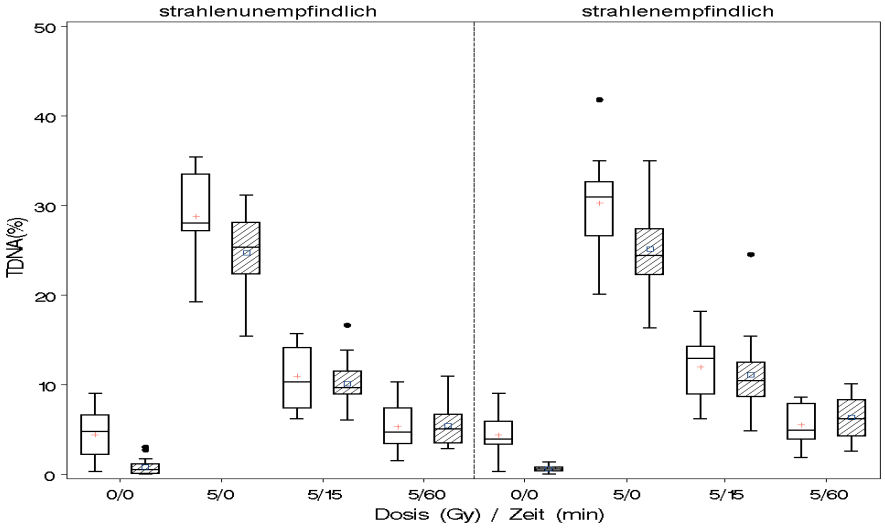


Abb. II.5.16: Vergleich der Tail DNA-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der primären Lymphozyten
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte.
Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	TDNA(%)	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis (Gy) / Zeit (min)							
		0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	4.44	28.78	10.96	5.33	4.39	30.29	11.98	5.51
	Median	4.79	27.99	10.32	4.67	3.90	30.94	12.92	4.87
	Spannweite	8.73	16.15	9.49	8.83	8.69	21.73	11.96	6.70
	Minimum	0.27	19.25	6.18	1.48	0.32	20.10	6.20	1.87
	Maximum	9.00	35.41	15.67	10.31	9.01	41.83	18.16	8.57
DKFZ	Mittelwert	0.82	24.74	10.16	5.48	0.62	25.14	11.13	6.39
	Median	0.52	25.31	9.68	5.05	0.57	24.40	10.44	6,.9
	Spannweite	3.07	15.75	10.65	8.07	1.34	18.66	19.76	7.54
	Minimum	0.00	15.40	6.01	2.83	0.00	16.34	4.80	2.53
	Maximum	3.07	31.15	16.67	10.90	1.34	35.00	24.55	10.07

Tab II.5.29: Vergleich der Messungen für Tail DNA (%) zwischen den Labors (primäre Lymphozyten)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

Ein gleiches Bild zeigt sich bei den immortalisierten Zelllinien, die aus den korrespondierenden Patienten-Lymphozyten gewonnen wurden (Abb.II.5.17) sowie für die dazugehörigen KORA-Zellen von gematchten Normalpersonen (Abb.II.5.18). Die dazugehörigen Kennzahlen stellen in Analogie zu Tab.II.5.29 die Tab.II.5.30 für die Zelllinien sowie Tab.II.5.31 für die KORA-Zellen dar. In gleicher Weise zeigt sich ein ähnliches Ergebnis für die laborinterne Kontrolle (Abb.II.5.19 und Tab.II.5.32).

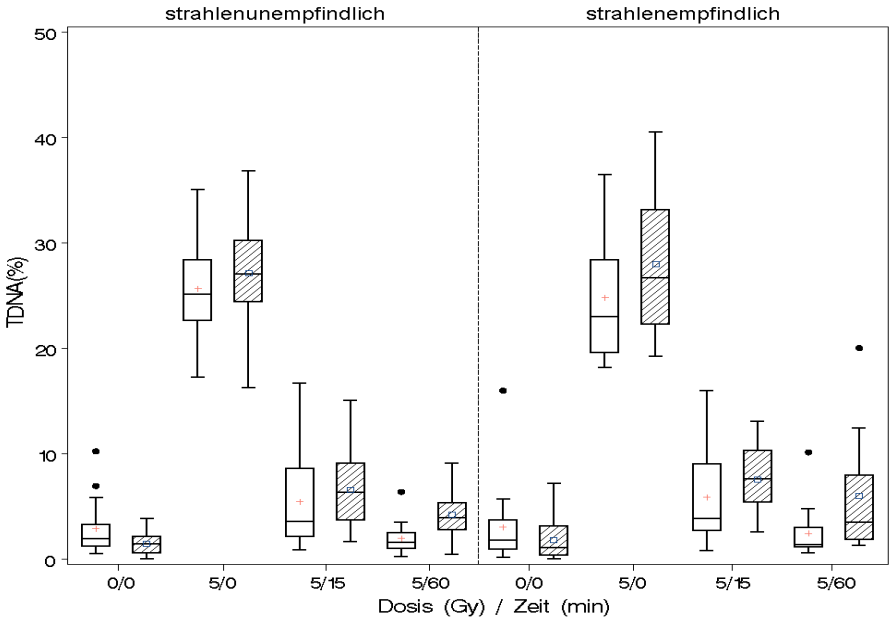


Abb. II.5.17: Vergleich der Tail DNA-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der Zelllinien
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte. Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	TDNA (%)	strahlenunempfindlich				strahlenempfindlich			
		Dosis (Gy) /Zeit (min)							
		0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	2.89	25.68	5.47	1.96	3.06	24.81	5.91	2.45
	Median	1.94	25.10	3.58	1.54	1.77	23.01	3.82	1.38
	Spannweite	9.73	17.82	15.83	6.21	15.84	18.29	15.21	9.59
	Minimum	0.52	17.25	0.83	0.20	0.17	18.19	0.78	0.57
	Maximum	10.25	35.07	16.66	6.40	16.01	36.47	15.99	10.16
DKFZ	Mittelwert	1.45	27.16	6.58	4.23	1.83	28.02	7.61	5.99
	Median	1.44	27.03	6.31	3.92	1.04	26.67	7.60	3.48
	Spannweite	3.82	20.60	13.35	8.63	7.15	21.30	10.53	18.74
	Minimum	0.00	16.21	1.66	0.43	0.00	19.22	2.54	1.31
	Maximum	3.82	36.82	15.01	9.06	7.15	40.52	13.07	20.05

Tab II.5.30: Vergleich der Messungen für Tail DNA (%) zwischen den Labors (Zelllinien)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

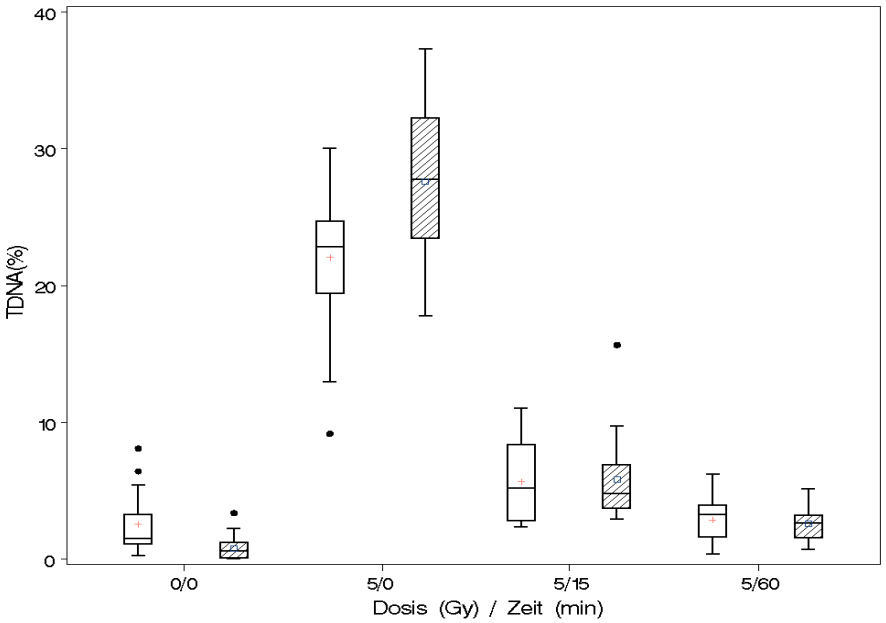


Abb. II.5.18: Vergleich der Tail DNA-Messungen zwischen den 2 Laboren innerhalb der KORA-Zellen
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte.
Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	TDNA (%)	Dosis (Gy) / Zeit(min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	2.57	22.08	5.69	2.87
	Median	1.50	22.79	5.16	3.24
	Spannweite	7.86	20.84	8.68	5.85
	Minimum	0.25	9.17	2.33	0.34
	Maximum	8.10	30.02	11.01	6.19
DKFZ	Mittelwert	0.78	27.61	5.81	2.59
	Median	0.56	27.74	4.75	2.62
	Spannweite	3.38	19.50	12.77	4.39
	Minimum	0.00	17.76	2.90	0.70
	Maximum	3.38	37.26	15.67	5.09

Tab II.5.31: Vergleich der Messungen für Tail DNA (%) zwischen den Labors (KORA-Zellen)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

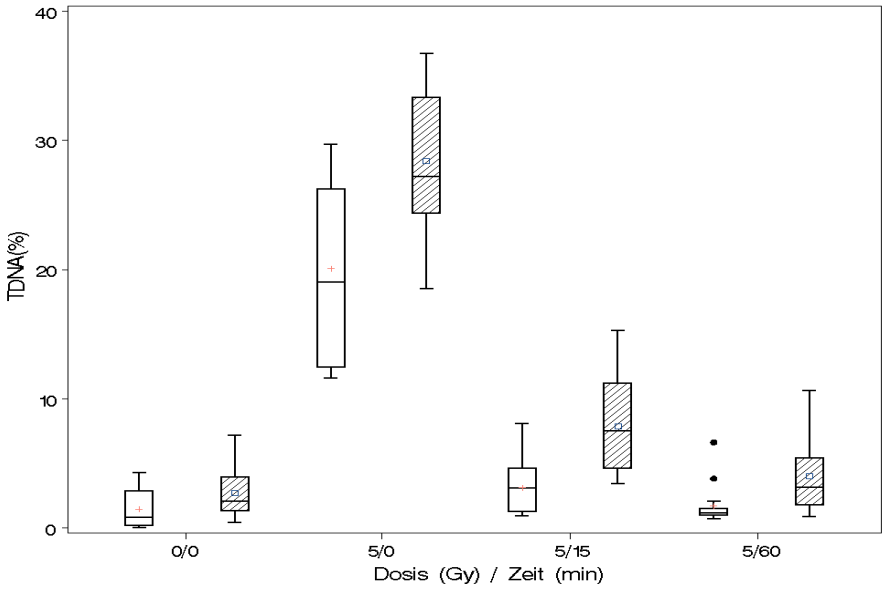


Abb. II.5.19: Vergleich der Tail DNA-Messungen zwischen den 2 Labors innerhalb der laborinternen Kontrolle
Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach jeweiliger Bestrahlungsdosis und Zeit. **Weiß:** BfS-München, **schraffiert:** DKFZ-Heidelberg.
Der Boxplot wird vom 25. und 75. Perzentil begrenzt. Deren innere Linie repräsentiert den Median, die Symbole jeweils die Mittelwerte.
Ausreißer um mehr als 1.5 Kastenlängen sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

Labor	TDNA (%)	Dosis (Gy) / Zeit (min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS	Mittelwert	1.45	20.07	3.13	1.71
	Median	0.78	19.00	3.06	1.13
	Spannweite	4.27	18.11	7.18	5.95
	Minimum	0.02	11.56	0.91	0.68
	Maximum	4.29	29.66	8.09	6.64
DKFZ	Mittelwert	2.70	28.42	7.88	4.00
	Median	2.03	27.16	7.49	3.12
	Spannweite	6.73	18.20	11.85	9.78
	Minimum	0.40	18.53	3.42	0.85
	Maximum	7.13	36.73	15.26	10.63

Tab II.5.32: Vergleich der Messungen für Tail DNA (%) zwischen den Labors (laborinterne Kontrolle)
Dargestellt sind die Lage- und Streuungsmaße getrennt nach jeweiliger Dosis und Zeit und den jeweiligen Labors.

In der Korrelationsanalyse mittels Spearman zeigen sich für Tail DNA(%) nur sehr geringe bis schwache Korrelationen (Tab.II.5.33).

Zellstatus Dosis(Gy)/Zeit(min)	BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg r_{sp} (95%KI)
primäre Lymphozyten	
0/0	0.255 [-0.121;0.560]
5/0	0.285 [-0.088;0.582]
5/15	0.228 [-0.147;0.541]
5/60	0.251 [-0.124;0.558]
Zelllinien	
0/0	0.039 [-0.327;0.393]
5/0	0.086 [-0.284;0.432]
5/15	0.280 [-0.094;0.578]
5/60	0.384* [0.021;0.650]
KORA-Zellen	
0/0	-0.179 [-0.629;0.373]
5/0	0.043 [-0.481;0.542]
5/15	0.157 [-0.391;0.616]
5/60	0.111 [-0.429; 0.581]
laborinterne Kontrolle	
0/0	-0.213 [-0.649;0.343]
5/0	0.079 [-0.454;0.566]
5/15	0.066 [-0.464;0.558]
5/60	0.302 [-0.259;0.700]

Tab. II.5.33: Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman rsp
Zusätzlich Angabe des 95%-Konfidenzintervalls.

Im Detail verweist die Tab.II.5.34 auf die Signifikanzberechnungen für die zu vergleichenden Messwerte beider Labore innerhalb der einzelnen Zelltypen und Dosis-/Zeitpunkte in Abhängigkeit von strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten. Hochsignifikante Unterschiede zeigten sich dabei erneut vor allem bei den primären Lymphozyten für die Messwerte 0Gy/0min und 5Gy/0min sowie, ähnlich zu den OTM-Ergebnissen, für die laborinterne Kontrolle in der Gruppe 5Gy/0min, 5Gy/15min und 5Gy/60min.

Sensitivität	Status	0Gy/0min	5Gy/0min	5Gy/15min	5Gy/60min
strahlenunempfindlich	**primäre Lymphozyten**	<0.001**	0.030*	0.277	0.804
strahlenempfindlich		<0.001**	0.003**	0.330	0.229
strahlenunempfindlich	**Zelllinien**	0.073	0.330	0.489	<0.001**
strahlenempfindlich		0.454	0.208	0.208	0.002**
	KORA-Zellen	0.010*	0.015*	0.934	0.639
	laborinterne Kontrolle	0.151	0.002**	0.001**	0.002**

Tab. II.5.34: Vergleich BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich München vs. Heidelberg.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Wilcoxon-Test)

Der Vergleich der Werte der strahlenunempfindlichen mit denen der strahlenempfindlichen Patienten erbrachte erneut, wie auch bei den OTM-Ergebnissen der Comet Assays sowie für die Apoptose- und gammaH2AX-Bestimmungen, keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tab.II.5.35). Eine hochsignifikante Dosis-Wirkungsbeziehung konnte jedoch in beiden Laboren auch für die „Tail DNA (%)"-Werte (wie auch bei den OTM-Werten) für alle Proben nachgewiesen werden (Tab.II.5.36).

Labor	Status	strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich			
		Dosis(Gy)/Zeit(min)			
		0/0	5/0	5/15	5/60
BfS-München	Primäre Lymphozyten	1.000	0.595	0.567	0.744
DKFZ-Heidelberg		0.689	0.935	0.624	0.267
BfS-München	Zelllinien	0.775	0.512	0.653	0.775
DKFZ-Heidelberg		0.838	0.902	0.345	0.806

Tab. II.5.35: Vergleich der Nekrose strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich nach Labor und Dosis
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich strahlenunempfindlich vs. strahlenempfindlich. p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test).

Labor	Status		Dosis (Gy)/Zeit(min) 0/0 vs. 5/0 vs. 5/15 vs. 5/60
BfS-München	Primäre Lymphozyten	strahlen-unempfindlich	<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Primäre Lymphozyten	strahlen-empfindlich	<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	KORA-Zelllinien		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**
BfS-München	Laborinterne Kontrolle		<0.001**
DKFZ-Heidelberg			<0.001**

Tab. II.5.36: Vergleich über die einzelnen Bestrahlungszeitpunkte
Gezeigt sind die p-Werte für den Vergleich der Zeiten nach Bestrahlung.
p>0.05 bedeutet kein signifikanter Unterschied. * signifikant auf dem 0.05-Niveau; ** hoch signifikant auf dem 0.01-Niveau (Friedmann-Test)

Im Vergleich BfS vs. DKFZ zeigte die Bland-Altman-Statistik für Tail DNA einen mittleren Bias von +2.1493 für die primären Lymphozyten, -1.3265 für die Zellinien, -0.8967 für die KORA-Zellen und -4.1603 innerhalb der laborinternen Kontrolle (Tab.II.5.37).

BfS-München vs. DKFZ-Heidelberg	primäre Lymphozyten	Zelllinien	KORA-Zelllinien	laborinterne Kontrolle
Bias	2.1493	-1.3265	-0.8967	-4.1603

Tab. II.5.37: Bias (mittlere Differenz der Messwerte zwischen BfS-München und DKFZ-Heidelberg)
Gezeigt sind die Bias-Werte (mittlere Differenz: BfS-DKFZ) getrennt nach den Zelltypen über alle Dosis-/Zeitpunkte.

Eine Übersicht in Bland-Altmann-Plots zeigt Abb.II.5.20 (a: primäre Lymphozyten, b: immortalisierte Zelllinien, c: KORA-Zellen, d: laborinterne Kontrolle).

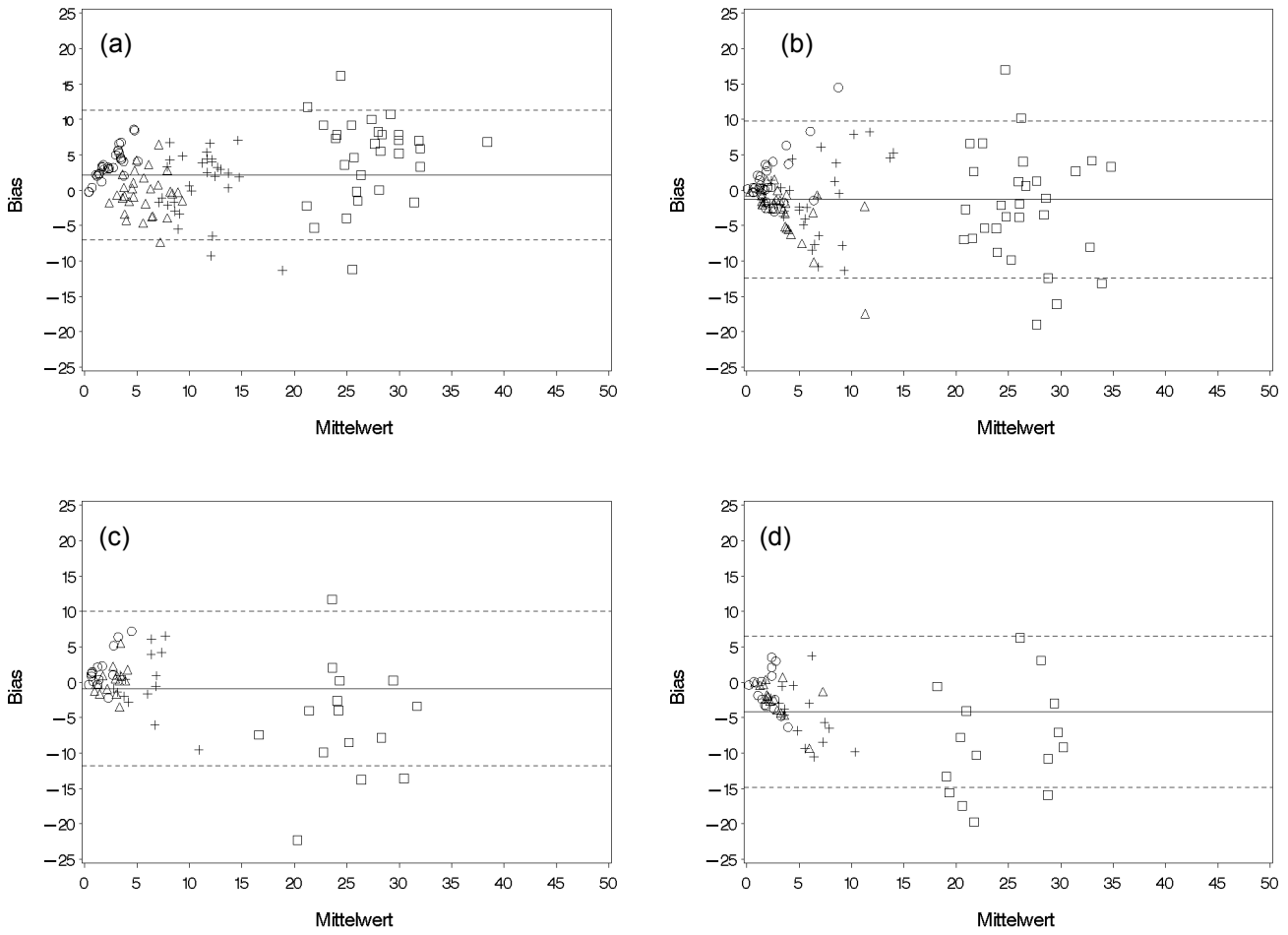


Abb.II.5.20: Bland-Altman-Plots zum Vergleich der Messungen zu Tail DNA (%) zwischen BfS-München und DKFZ-Heidelberg für die primären Lymphozyten **(a)**, Zelllinien **(b)**, KORA-Zellen **(c)** und laborinterner Kontrolle **(d)** innerhalb 4 verschiedener Dosis/Zeit-Endpunkte: 0Gy-0min (○), 5Gy-0min (□), 5Gy-15min (+), 5Gy-60min (△)
Die x-Koordinate beschreibt den Mittelwert, die y-Achse zeigt die Differenz zwischen beiden Labormessungen für jedes Datenpaar (Differenz BfS – DKFZ)

II.5.4. Kurzzusammenfassung

Zusammenfassend zeigten sich damit deutliche, in vielen Fällen auf dem 0,01-Niveau hochsignifikante Unterschiede im Interlaborvergleich für die verschiedenen Testverfahren. In den meisten Verfahren war jedoch eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung der Strahlendosen nachweisbar. Eine statistische Signifikanz beim Vergleich der Proben im Hinblick auf Strahlenempfindlichkeit zwischen strahlenempfindlichen Patienten mit denen strahlenunempfindlicher Patienten konnte für keinen Test gezeigt werden.

Zur weiteren Analyse der Proben insbesondere in Hinblick auf „Ausreißer"-Proben wurde eine weitergehende Matrix-Berechnung durchgeführt, dessen Ergebnisse in Tab. II.5.38 dargestellt sind. Die Matrix wurde entwickelt als Einheit aus Spaltenvektoren, die die jeweiligen Laboruntersuchungen mit den zugehörigen Dosis-/Zeitpunkten bildeten und den entsprechenden Zeilenvektoren, welche den 30 Patienten entsprachen. Die Komponenten innerhalb der Matrix, als „Marker" zur Kennzeichnung von Normwerten und auffälligen Proben, wurden nach folgenden Festlegungen bestimmt:

Als Grundlage zur Definition von auffälligen Proben, sowohl unter den strahlenempfindlichen als auch unter den strahlenunempfindlichen, diente für alle Labore die jeweilige laborinterne Kontrolle. Um alle gemessenen Daten auf einem einheitlichen Niveau miteinander vergleichbar zu machen, wurden alle Messwerte in die Standardnormalverteilung Z:N(0,1) transformiert. Für die folgende Festlegung zur Bestimmung von Ausreißern wurde durch die Grenzen der transformierten laborinternen Standardkontrolle zwischen $-1.96 \leq Z \geq +1.96$ der 95%-Referenzbereich bestimmt, innerhalb dessen Messwerte noch im Normbereich lagen und somit als unauffällig galten. Entsprechend deuteten Werte jenseits dieses Grenzbereichs auf auffällige Proben hin. Vorherige Analysen mit Intervallgrenzen im 99%-Referenzbereich gewährten einen zu großen Toleranzbereich, so dass alle Proben innerhalb des gültigen Normbereichs lagen. Infolgedessen wurde der Gültigkeitsbereich nach obigem Verfahren zum 95%-Normbereich modifiziert. Das Resultat dieser Matrix bekräftigte die Ergebnisse, die sich aus vorangegangenen Analysen in den einzelnen Laboren auch ergaben.

Hinsichtlich des Vergleichs der Häufigkeiten auffälliger Proben zwischen strahlenempfindlichen und strahlenunempfindlichen Patienten über die gesamte Matrix konnte kein Unterschied nachgewiesen werden. So stellten sich unter allen zu untersuchenden Parametern innerhalb der strahlenempfindlichen Patienten insgesamt 65 Marker über alle zu untersuchenden Endpunkte als auffällig heraus, gegenüber 72 auffälligen Markern unter den strahlenunempfindlichen Patienten.

Tab. II.5.38(a): Matrix als Übersicht aller gemessener Einzel-Parameter – Comet Assay

Gezeigt sind die auffällig hohen Ausreisser (+), die auffällig niedrigen Ausreisser (-), sowie diejenigen Werte, welche im 95%-Referenzbereich lagen und somit als unauffällig galten (▪), jeweils getrennt nach strahlenempfindlich und strahlenunempfindliche Patienten.
Die positiven bzw. negativen Ausreisser innerhalb der laborinternen Kontrolle wurden zusätzlich zu jedem Endpunkt unter Angabe der Ringversuchsnummer 1-15 angegeben (Ausreisser Kontrollen). Die Matrixkriterien zum Comet-Assay beruhten auf der Unterscheidung nach: Zelltyp: primäre Lymphozyten (Primär) bzw. Zelllinien (LCL), nach Dosis(Gy)/Zeit(min): 0/0, 5/0, 5/15, 5/60 sowie nach Labor (BfS/DKFZ) und dem jeweiligen untersuchten Parameter: Olive Tail Moment (OTM) und Tail DNA (TDNA).

Patient	Comet - Assay Olive Tail Moment (OTM)																Comet-Assay % DNA in Tail (TDNA)															
Strahlen-empfindlich	BfS								DKFZ								BfS								DKFZ							
	Primär				LCL				Primär				LCL				Primär				LCL				Primär				LCL			
	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
10A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
11A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
12B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
13B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+
14A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
15A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
1B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
2B	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪
3A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
4B	▪	▪	▪	▪	+	▪	+	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	+	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
5B	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6A	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪
7A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
8A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
9B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪

Patient	Comet - Assay Olive Tail Moment (OTM)																Comet - Assay % DNA in Tail (TDNA)															
Strahlen-unempfindlich	BfS								DKFZ								BfS								DKFZ							
	Primär				LCL				Primär				LCL				Primär				LCL				Primär				LCL			
	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60	0/0	5/0	5/15	5/60
10B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
11B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
12A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	-	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+
13A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	-	▪	▪	▪	-	▪	▪
14B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
15B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
1A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
2A	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
3B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪
4A	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
5A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	+	▪	+	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	▪	▪	+	▪
7B	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
8B	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
9A	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
Ausreisser Kontrollen	4+		12+	5+	4+		12+	5+			3+	3+			3+	3+			12+	5+			12+	5+	6+	13-	3+	6+	6+	13-	3+	6+

Tab. II.5.38 (b): Matrix als Übersicht aller gemessener Einzel-Parameter – Apoptose
Apoptose (A), Nekrose (N) und Toten Zellen (T), Dosis(Gy): 0, 0.4,0.8, Labor (FLI-Jena,GSF-München,UKM-Münster)

Patient	Apoptose															Apoptose															Apoptose													
Strahlen-empfindlich	FLI Jena															GSF München															UKM Münster													
	Rohwerte									strahleninduziert						Rohwerte									strahleninduziert						Rohwerte									strahleninduziert					
	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8
10A	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+
4B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
5B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Patient	Apoptose															Apoptose															Apoptose													
Strahlen-unempfindlich	FLI Jena															GSF München															UKM Münster													
	Rohwerte									strahleninduziert						Rohwerte									strahleninduziert						Rohwerte									strahleninduziert					
	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8	A-0	A-0.4	A-0.8	N-0	N-0.4	N-0.8	T-0	T-0.4	T-0.8	A-0.4	A-0.8	N-0.4	N-0.8	T-0.4	T-0.8
10B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	-	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	-	-	-	-
4A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Ausreisser	9-	9-								9-	2-		7+	9-		14-	14-	14-		14-	14-		14-	14-	14-	14-	10-	9+		14-														
Kontrollen																				5-	5-		5-																					

Tab. II.5.38 (c): Matrix als Übersicht aller gemessener Einzel-Parameter – γ-H2AX
Dosis(Gy)/Zeit(h): 0/24, 2/0.25h, 2/1, 2/4, 2/24, Labor: FLI-Jena, GSF-München, Zellen: primäre Lymphozyten(primär), Zelllinien (LCL), k.A. (keine Angaben)

Patient Empf.	γ-H2AX																	γ-H2AX																
	FLI Jena																	GSF München																
	Primär									LCL								Primär									LCL							
	Rohwerte					strahleninduziert				Rohwerte					strahleninduziert			Rohwerte					strahleninduziert				Rohwerte					strahleninduziert			
	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24
10A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.
13B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	k.A.	.	.	.	k.A.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.
15A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	+	.
1B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Patient Unempf.	γ-H2AX																	γ-H2AX																
	FLI Jena																	GSF München																
	Primär									LCL								Primär									LCL							
	Rohwerte					strahleninduziert				Rohwerte					strahleninduziert			Rohwerte					strahleninduziert				Rohwerte					strahleninduziert			
	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	0|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24	2|0.25	2|1	2|4	2|24
10B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	.	.	.	.
13A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	k.A.	.	.	.	k.A.	.
14B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.
1A	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.
7B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ausreisser			9-						9-			9-						9-	12+	12+	12+	12+	12+	13+	15+			12+	12+	12+	12+	12+	13+	15+		
Kontrollen			13+									13+																							

III. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Greve B., Bölling T., Rickinger A., Dreffke K., Fritz E., Eckardt-Schupp F., Gomolka M., Amler S., Braselmann H., Willich N., Schmezer P., Könemann S.: Primary Lymphocytes versus Lymphoblastoidal Celllines – Multicentric Investigation of Apoptosis as a Predictive Parameter of Individual Radiosensitivity. In preparation

Greve B., Bölling T., Könemann S., Rickinger A., Dreffke K., Fritz E., Eckardt-Schupp F., Willich N.: Immortalized Versus Primary Lymphocytes –Induction of Apoptosis by Ionizing Radiation. Posterbeitrag auf dem DEGRO-ÖGRO-Kongress Wien 2008, Strahlentherapie und Onkologie 184 (1), pp 118

A. Rickinger, K. Dreffke, W. Sauter, T. Illig, T. Bölling, B. Greve, M. Gomolka, U. Rössler, P. Schmezer, E. Fritz, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
Detection of individual radiosensitivity in lymphocytes and corresponding lymphoblastoid cell lines 10. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS), Mainz, 2007

K. Dreffke, A. Rickinger, W. Sauter, T. Illig, T. Bölling, U. Rössler, M. Gomolka, P. Schmezer, F. Eckardt-Schupp, E. Fritz. Individual Radiosensitivity - Differences between primary and EBV-immortalized patient cells" (Poster)
(10. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung - Wirkung von Strahlung auf zelluläre Systeme"; Mainz, 10.-12. Oktober 2007)

A. Rickinger, K. Dreffke, W. Sauter, T. Illig, T. Bölling, B. Greve, M. Gomolka, U. Rössler, P. Schmezer, E. Fritz, F. Eckardt-Schupp, S. Mörtl
Are Apoptosis and DNA repair crucial for individual radiosensitivity?
XX International Congress of Genetics, Berlin, 2008

Mayer et al. Gene expression profiling as tool to predict radiotherapy induced side effects. In preparation

„H2A-X als Biomarker für klinische Strahlenempfindlichkeit“ (Manuskript in Planung)

IV. Literatur

Archambeau JO, Pezner R, Wassermann T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995; 31:1171-1185.

Baumann M. Impact of endogenous and exogenous factors on radiation sequelae. In: Dunst J, Suaer R, Hrsg: Late sequelae in oncology. Medical radiology, diagnostic imaging and radiation oncology. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1995

Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Annals of Statistics (2001), 29, 1165-1188.

Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1(8476):307-10.

Borgmann K, Roper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dork T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. Radiother Oncol. 2002 (64) 141-152.

Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Roepper B, Brackrock S, Petersen C, Szymczak S, Ziegler A, Feyer P, Alberti W, Dikomey E. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2008;71:256-64.

Budach W, Claßen J, Belka C, Bamberg. M. Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity. Strahlenthera Onkol 1998; 174 Suppl. III; 20-24

Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, Duong J, Kieff E. NF-κB inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. PNAS, 2000, 97(11): 6055-6060

Cohen JI. Epstein-Barr virus infection, Medical Progress, 2000, 343(7): 481-492

Cooper JS, FU K, Marks J, Silverman S. Late effects of radiation therapy in the head and neck region. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1141-1164.

Cox JD, Stetz JA, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1341-1346.

Dörr W. Radiobiological models of normal tissue reactions. Strahlenther Onkol 1998; 174 Suppl. III; 4-7

Goeman J, Buehlmann P. Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. Bioinformatics 2007; 23:980-987.

Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. 1993. PNAS, 90: 8479-8483

Ismail HI, Wadhra TI, Hammarsten O. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in gamma-H2AX response among humans, Nucleic Acids Res, 2007, 35(5): e36

Kuhn K, Baker SC, Chudin E, Lieu MH, Oeser S, Bennett H, Rigault P, Barker D, McDaniel TK, Chee MS. A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. Genome Res., 2004; 14: 2347 - 2356

Lee JM, Lee KH, Farrell CJ, Ling PD, Kempkes B, Park JH, Hayward SD. EBNA2 is required for protection of latently Epstein-Barr Virus-infected B cells against specific apoptotic stimuli, J Virol, 2004, 78(22): 12694-12697

LENT SOMA scales for all anatomic sites. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1049-1091.

Löbrich M and Kiefer J. Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. Int J Cancer, 2006, 118(11): 2652-6.

Mansmann U, Meister R. Testing differential gene expression in functional groups, Methods Inf Med 2005; 44: 449-453.

Mayer C, Popanda O, Zelezny O, Brevern MC, Bach A, Bartsch H and Schmezer P. DNA repair capacity after γ-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes, DNA Repair, 2002, I:237-250

Olive PL, Banath JP. Phosphorylation of of Histone H2AX as a measure of radiosensitivity, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58(2): 331-335

Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, Gonzalez-Gonzalez B, Horiot JC, Bolla M, Bartelink H. Late effects toxicity scoring: The soma scale. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1043-1047.

Riesenbeck D, Dörr W, Feyerabend T, Fietkau R, Henne K, Richter E. Schendera A. Photographic documentation of acute radiation-induced side effects of the oral mucosa. Strahlenther Onkol 1998; 174 Suppl. III; 40-43

Rübe CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rübe C. DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008a, 72(4): 1180-1187

Rübe CE Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe C. DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing, Clin Cancer Res, 2008b, 14(20): 6546-6555

Rubin P, Constine LS, Fajardo LF, Phillips TL, Wassermann TD. Overview: Late effects of normal tissues (LENT) scoring system. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31: 1041-1042.

Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrün S, Pöttgen C, Groneberg M, Stuschke M., Gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment, Int J Radiat Biol, 2007, 83(10): 639-652

Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Goldin L, Thomas G. Heritability of susceptibility to ionizing radiation induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 68(4) 1169-1177

Severin E, Greve B, Pascher E, Wedemeyer N, Hacker-Klom U, Silling G, Kienast J, Willich N, Göhde W. Evidence for predictive validity of blood assays to evaluate individual radiosensitivity, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(1): 242-250

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 3: Article3

Sonis S, Haddad R, Posner M, Watkins B, Frey E, Morgan TV, Mookanamparambil L, Ramoni M. Gene expression changes I peripheral blood cells provide insight into the biological mechanisms associated with regimen-related toxicities in patients being treated for head and neck cancers. 2007, Oral Oncology, 43, 289-300

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S , Ebert BL, Gilette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander E, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. PNAS, 2005, vol102, 43, 15545-15550

Surnimal P. und Amundson S.A. Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2008, 71, 1236-1244.

Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ, Weichselbaum RR. Histone H2AX Phosphorylation as a Predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy, J Biol Chem, 2004, 279(3): 2273-2280

Tucker SL, Geara FB, Peters LJ, Brock WA: How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal –tissue radiosensitivity? Radiother Oncol 1996; 38; 103-113

Westfall PH and Young SS (1993). Resampling-based multiple testing: Examples and methods for p-value adjustment, John Wiley & Sons. S.66.

Wistop A, Keller U, Sprung CN, Grabenbauer GG, Sauer R, Distel LV. Individual radiosensitivity does not correlate with radiation-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines or CD3+ lymphocytes. Strahlenther Onkol 2005; 181:326-35.

Zou P, Kawada J, Pesnicak L, Cohen JI. Bortezomib induces apoptosis of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed B cells and prolongs survival of mice inoculated with EBV-transformed B cells, J Virol, 2007,81(18): 10029-10036

V. Anlagen

1.Tabellen: Strahlenabhängige Regulation der Genexpression

2. Erfolgskontrollbericht

Tabelle: Strahlenabhängige Regulation der Genexpression in primären Zellen, n = 24 (IFold changeI > 1.5, adjustierter p-Wert < 0.05)

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
FDXR	ILMN_4832	NM_024417.1	0.001	12.30
TNFSF7	ILMN_19983	NM_001252.2	0.001	6.13
ISG20L1	ILMN_12401	NM_022767.2	0.001	5.44
PCNA	ILMN_6858	NM_182649.1	0.001	5.15
TNFRSF10B	ILMN_5337	NM_003842.3	0.001	3.88
GADD45A	ILMN_17355	NM_001924.2	0.001	3.50
VWCE	ILMN_18416	NM_152718.1	0.001	3.34
TNFSF4	ILMN_8432	NM_003326.2	0.001	3.22
DDB2	ILMN_425	NM_000107.1	0.001	3.00
TRIAP1	ILMN_13988	NM_016399.2	0.001	2.79
SESN1	ILMN_5404	NM_014454.1	0.001	2.78
PHPT1	ILMN_21637	NM_014172.2	0.001	2.75
PHLDA3	ILMN_24559	NM_012396.2	0.001	2.74
ACTA2	ILMN_6588	NM_001613.1	0.001	2.58
IGFBP4	ILMN_9309	NM_001552.2	0.001	2.57
XPC	ILMN_4555	NM_004628.3	0.001	2.35
RPS27L	ILMN_28649	NM_015920.3	0.001	2.34
PPM1D	ILMN_7760	NM_003620.2	0.001	2.20
IER5	ILMN_18737	NM_016545.3	0.001	2.16
SLC7A6	ILMN_3730	NM_003983.3	0.001	2.08
NME1	ILMN_22180	NM_198175.1	0.001	2.07
CDKN1A	ILMN_5895	NM_078467.1	0.001	2.06
HIST1H2BD	ILMN_17622	NM_138720.1	0.001	2.03
MTHFD1L	ILMN_20988	NM_015440.3	0.001	2.02
CD80	ILMN_2131	NM_005191.2	0.003	2.01
FHL2	ILMN_20831	NM_001450.3	0.001	1.99
C21orf42	ILMN_15559	NM_058184.1	0.001	1.97
TP53INP1	ILMN_16203	NM_033285.2	0.001	1.96
ATF3	ILMN_6468	NM_001030287.1	0.028	1.96
IL21R	ILMN_12364	NM_181078.1	0.001	1.95
CD40	ILMN_22820	NM_001250.3	0.003	1.95
IRF4	ILMN_12414	NM_002460.1	0.003	1.89
C12orf5	ILMN_11001	NM_020375.1	0.001	1.89
TRAF4	ILMN_1853	NM_004295.2	0.006	1.89
ABTB2	ILMN_22109	NM_145804.1	0.003	1.85
CCNG1	ILMN_9417	NM_199246.1	0.001	1.85
FAS	ILMN_9068	NM_152871.1	0.001	1.81
PSAT1	ILMN_17460	NM_021154.3	0.003	1.80
C3orf15	ILMN_28867	NM_033364.2	0.001	1.80
ARP10	ILMN_18618	NM_181773.2	0.002	1.78
BAX	ILMN_10832	NM_004324.3	0.002	1.78
ASCC3	ILMN_6018	NM_006828.2	0.002	1.76
BCL2L1	ILMN_12148	NM_138578.1	0.002	1.76
PYCR1	ILMN_8761	NM_153824.1	0.002	1.72
FBXO22	ILMN_10148	NM_147188.1	0.001	1.71
TNFRSF18	ILMN_22838	NM_148901.1	0.003	1.69
ZNF79	ILMN_23438	NM_007135.1	0.001	1.69
EI24	ILMN_8791	NM_004879.3	0.001	1.68
FBXO22	ILMN_5718	NM_012170.2	0.001	1.68
BLR1	ILMN_19896	NM_032966.1	0.009	1.68
FOSB	ILMN_13603	NM_006732.1	0.007	1.67
LOC134147	ILMN_1485	NM_138809.2	0.002	1.67
CCND1	ILMN_139141	NM_053056.1	0.001	1.67
NFKB2	ILMN_26475	NM_002502.2	0.003	1.67
PHF16	ILMN_3092	NM_014735.2	0.001	1.66

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
GPR137	ILMN_24699	NM_020155.2	0.001	1.65
TNFSF9	ILMN_18030	NM_003811.2	0.001	1.63
TLCD1	ILMN_16042	NM_138463.2	0.002	1.62
TNFRSF10D	ILMN_17600	NM_003840.3	0.001	1.62
E2F7	ILMN_4548	NM_203394.1	0.003	1.62
JAM2	ILMN_12795	NM_021219.2	0.001	1.62
MDM2	ILMN_21265	NM_002392.2	0.001	1.61
CD83	ILMN_16705	NM_004233.2	0.001	1.61
SAC3D1	ILMN_9385	NM_013299.2	0.001	1.61
PRKAB1	ILMN_23188	NM_006253.4	0.001	1.61
SLC7A1	ILMN_22619	NM_003045.3	0.002	1.61
HIST1H2BD	ILMN_17622	NM_138720.1	0.005	1.59
C19orf36	ILMN_137890	NM_001031735.1	0.001	1.59
TYMS	ILMN_26899	NM_001071.1	0.039	1.58
TRIM22	ILMN_532	NM_006074.2	0.045	1.58
MGC13170	ILMN_16271	NM_199249.1	0.001	1.58
ECE1	ILMN_20910	NM_001397.1	0.003	1.57
POLH	ILMN_21573	NM_006502.1	0.005	1.56
BAIAP2L1	ILMN_16050	NM_018842.3	0.002	1.56
PYHIN1	ILMN_12129	NM_198929.2	0.001	1.56
ASNS	ILMN_14195	NM_133436.1	0.007	1.56
PERP	ILMN_4512	NM_022121.2	0.006	1.55
GLS2	ILMN_2822	NM_013267.2	0.002	1.55
FCER2	ILMN_12030	NM_002002.3	0.005	1.54
GNG8	ILMN_25463	NM_033258.1	0.003	1.54
PRR5	ILMN_5069	NM_001017530.1	0.001	1.54
BRMS1L	ILMN_11636	NM_032352.3	0.001	1.53
C12orf25	ILMN_9541	NM_032130.1	0.002	1.53
IKIP	ILMN_10278	NM_153687.2	0.002	1.52
RRAS2	ILMN_30083	NM_012250.3	0.003	1.52
SNFT	ILMN_7180	NM_018664.1	0.008	1.51
SCD	ILMN_25431	NM_005063.4	0.04	1.51
PLK3	ILMN_8968	NM_004073.2	0.002	1.51
RCN1	ILMN_8159	NM_002901.1	0.002	1.50
PAICS	ILMN_6032	NM_006452.2	0.044	1.50
ARHGEF6	ILMN_26689	NM_004840.2	0.001	0.67
SLC44A2	ILMN_5176	NM_020428.2	0.001	0.67
SH2D3C	ILMN_8703	NM_170600.1	0.002	0.67
INPP5D	ILMN_10862	NM_001017915.1	0.001	0.67
SUSD3	ILMN_11008	NM_145006.2	0.001	0.67
DEF6	ILMN_27305	NM_022047.2	0.002	0.66
MGC17624	ILMN_26575	NM_206967.1	0.002	0.66
CCND3	ILMN_2459	NM_001760.2	0.001	0.66
FAM62A	ILMN_25454	NM_015292.1	0.001	0.65
C16orf30	ILMN_25974	NM_024600.1	0.002	0.65
BRDG1	ILMN_7936	NM_012108.1	0.007	0.65
MUM1	ILMN_23934	NM_032853.2	0.001	0.64
NMT2	ILMN_7780	NM_004808.1	0.002	0.64
IL16	ILMN_6720	NM_172217.1	0.001	0.64
CD72	ILMN_20590	NM_001782.1	0.006	0.64
SEMA4B	ILMN_25026	NM_020210.2	0.003	0.63
ZNF395	ILMN_17231	NM_018660.2	0.007	0.63
TRAF5	ILMN_8631	NM_004619.3	0.001	0.62
C9orf111	ILMN_22221	NM_152286.2	0.003	0.62
FCRLM1	ILMN_2598	NM_032738.3	0.016	0.62
GGA2	ILMN_17168	NM_015044.3	0.003	0.62
LYL1	ILMN_18317	NM_005583.3	0.002	0.62
KLF2	ILMN_9994	NM_016270.2	0.001	0.61
TNFSF12	ILMN_24599	NM_003809.2	0.001	0.61

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
OSBPL10	ILMN_11112	NM_017784.3	0.001	0.61
PTPRCAP	ILMN_8267	NM_005608.2	0.003	0.61
PRICKLE1	ILMN_15149	NM_153026.1	0.001	0.61
ACTN1	ILMN_28160	NM_001102.2	0.043	0.60
HIP1R	ILMN_23615	NM_003959.1	0.001	0.60
TBC1D10C	ILMN_19480	NM_198517.2	0.001	0.60
LOC90925	ILMN_10080	NM_175870.3	0.002	0.60
CD19	ILMN_2004	NM_001770.3	0.001	0.60
LY9	ILMN_22187	NM_002348.2	0.002	0.59
LHPP	ILMN_15724	NM_022126.2	0.002	0.59
C9orf45	ILMN_21803	NM_030814.4	0.001	0.59
FCRL2	ILMN_3325	NM_138738.2	0.002	0.58
HPCAL1	ILMN_11657	NM_002149.2	0.007	0.58
UCP2	ILMN_14172	NM_003355.2	0.01	0.57
RNASET2	ILMN_412	NM_003730.3	0.003	0.57
KIAA0125	ILMN_6408	NM_014792.2	0.001	0.57
CENTB1	ILMN_6952	NM_014716.2	0.001	0.57
GZMA	ILMN_21648	NM_006144.2	0.003	0.57
SIPA1	ILMN_17494	NM_153253.28	0.001	0.56
MGC24665	ILMN_5047	NM_152308.1	0.001	0.56
ADAM28	ILMN_4121	NM_021777.2	0.002	0.55
BTK	ILMN_28021	NM_000061.1	0.015	0.55
TCL1A	ILMN_21642	NM_021966.1	0.002	0.54
ADAM28	ILMN_4121	NM_021777.2	0.001	0.54
IGJ	ILMN_23930	NM_144646.2	0.002	0.54
BCAS4	ILMN_21706	NM_017843.3	0.001	0.53
HLA-DMB	ILMN_2252	NM_002118.3	0.002	0.52
BANK1	ILMN_25922	NM_017935.2	0.001	0.51
AFF3	ILMN_25998	NM_002285.2	0.002	0.50
ELL3	ILMN_26458	NM_025165.2	0.001	0.49
CD79B	ILMN_138839	NM_021602.1	0.002	0.47
CCR6	ILMN_8000	NM_031409.2	0.001	0.46
RASGRP2	ILMN_10397	NM_005825.2	0.001	0.43
CD79A	ILMN_137396	NM_001783.2	0.001	0.41
CD79A	ILMN_137396	NM_001783.2	0.001	0.40
CD79B	ILMN_139125	NM_000626.1	0.001	0.34
VPREB3	ILMN_2270	NM_013378.1	0.002	0.33
SLC2A5	ILMN_14785	NM_003039.1	0.001	0.31
GNG7	ILMN_22105	NM_052847.1	0.001	0.26

Strahlenabhängige Regulation der Genexpression in EBV-transformierten Zellen, n = 24; (IFold changel > 1.5, adjustierter p-Wert < 0.05)

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
PHLDA3	ILMN_24559	NM_012396.2	0.001	3.35
SESN1	ILMN_5404	NM_014454.1	0.001	3.30
VWCE	ILMN_18416	NM_152718.1	0.001	3.08
CDKN1A	ILMN_5895	NM_078467.1	0.001	3.05
GDF15	ILMN_2688	NM_004864.1	0.001	2.90
FDXR	ILMN_4832	NM_024417.1	0.001	2.53
GADD45A	ILMN_17355	NM_001924.2	0.001	2.43
CDKN1A	ILMN_5895	NM_078467.1	0.001	2.43
FHL2	ILMN_20831	NM_001450.3	0.001	2.34
XPC	ILMN_4555	NM_004628.3	0.001	2.24
PPM1D	ILMN_7760	NM_003620.2	0.001	2.23
ASTN2	ILMN_16734	NM_014010.3	0.001	2.16
LOC134147	ILMN_1485	NM_138809.2	0.001	2.12
CEACAM1	ILMN_20142	NM_001024912.1	0.001	2.11
TRIAP1	ILMN_13988	NM_016399.2	0.001	2.08
DDB2	ILMN_425	NM_000107.1	0.001	2.02
C12orf5	ILMN_11001	NM_020375.1	0.001	2.00
PAPLN	ILMN_4286	NM_173462.2	0.001	2.00
TP53I3	ILMN_2007	NM_147184.1	0.001	1.98
E2F7	ILMN_4548	NM_203394.1	0.001	1.97
LRDD	ILMN_767	NM_018494.3	0.001	1.96
OTP	ILMN_4247	NM_032109.2	0.001	1.94
ATF3	ILMN_6468	NM_001030287.1	0.001	1.92
PSTPIP2	ILMN_16733	NM_024430.2	0.001	1.91
SESN2	ILMN_7290	NM_031459.3	0.001	1.91
PXT1	ILMN_21991	NM_152990.2	0.001	1.89
RRM2B	ILMN_11053	NM_015713.3	0.001	1.89
GAL3ST4	ILMN_27424	NM_024637.3	0.001	1.87
ISG20L1	ILMN_12401	NM_022767.2	0.001	1.86
FLJ11259	ILMN_20048	NM_018370.1	0.001	1.82
PRKAB1	ILMN_23188	NM_006253.4	0.001	1.82
GLS2	ILMN_2822	NM_013267.2	0.001	1.79
NINJ1	ILMN_21540	NM_004148.2	0.001	1.78
ANKRA2	ILMN_16224	NM_023039.2	0.001	1.76
HES2	ILMN_15240	NM_019089.3	0.001	1.75
FBXO22	ILMN_5718	NM_012170.2	0.001	1.72
TNFRSF10B	ILMN_5337	NM_003842.3	0.001	1.70
RGS12	ILMN_15717	NM_002926.2	0.002	1.70
ZNF79	ILMN_23438	NM_007135.1	0.001	1.70
SERTAD1	ILMN_7061	NM_013376.1	0.001	1.70
RGS16	ILMN_16445	NM_002928.2	0.001	1.69
IBRDC3	ILMN_1442	NM_153341.1	0.001	1.69
CYP4F3	ILMN_20221	NM_000896.1	0.001	1.69
BAIAP2L1	ILMN_16050	NM_018842.3	0.001	1.68
ZNF337	ILMN_3280	NM_015655.2	0.001	1.66
CABC1	ILMN_17033	NM_020247.3	0.001	1.66
MGC59937	ILMN_13120	NM_199001.1	0.001	1.66
PCNA	ILMN_6858	NM_182649.1	0.002	1.65
EDA2R	ILMN_20922	NM_021783.2	0.001	1.65

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
TM7SF3	ILMN_7797	NM_016551.1	0.001	1.65
SPATA18	ILMN_20280	NM_145263.1	0.001	1.64
WIG1	ILMN_9027	NM_152240.1	0.001	1.63
INPP1	ILMN_15372	NM_002194.2	0.001	1.63
FBXO22	ILMN_10148	NM_147188.1	0.001	1.62
EI24	ILMN_8791	NM_004879.3	0.001	1.62
PLEKHF1	ILMN_25787	NM_024310.2	0.001	1.62
TP53INP1	ILMN_16203	NM_033285.2	0.001	1.61
BRMS1L	ILMN_11636	NM_032352.3	0.001	1.61
MDM2	ILMN_21265	NM_002392.2	0.001	1.60
TMEM57	ILMN_139394	NM_018202.2	0.001	1.60
ZFP90	ILMN_4714	NM_133458.1	0.001	1.60
MGC26718	ILMN_27823	NM_001029999.1	0.001	1.60
FUCA1	ILMN_14069	NM_000147.2	0.004	1.60
STS-1	ILMN_20786	NM_032873.3	0.001	1.59
C12orf54	ILMN_26449	NM_152319.2	0.003	1.59
CP110	ILMN_12815	NM_014711.3	0.001	1.59
TTYH3	ILMN_22026	NM_025250.2	0.001	1.58
DUSP14	ILMN_9561	NM_007026.1	0.001	1.58
TNFSF9	ILMN_18030	NM_003811.2	0.001	1.58
RetSat	ILMN_28492	NM_017750.2	0.001	1.57
ZFYVE1	ILMN_6420	NM_021260.1	0.001	1.57
C10orf10	ILMN_8623	NM_007021.2	0.001	1.57
SCRIB	ILMN_1684	NM_015356.2	0.001	1.57
SULF2	ILMN_18271	NM_018837.2	0.004	1.57
FLJ45909	ILMN_137811	NM_198445.1	0.001	1.57
FAS	ILMN_9068	NM_152871.1	0.001	1.56
IER5	ILMN_18737	NM_016545.3	0.001	1.55
EI24	ILMN_8791	NM_004879.3	0.001	1.55
TNFSF7	ILMN_19983	NM_001252.2	0.001	1.54
IER3	ILMN_14915	NM_052815.1	0.001	1.54
FEZ1	ILMN_28992	NM_005103.3	0.001	1.54
FOSL1	ILMN_2127	NM_005438.2	0.001	1.53
HRAS	ILMN_11181	NM_176795.2	0.001	1.53
MGC13024	ILMN_13465	NM_152288.1	0.001	1.52
TNFSF4	ILMN_8432	NM_003326.2	0.003	1.51
BUB1B	ILMN_15300	NM_001211.4	0.001	0.66
SH2D3C	ILMN_8703	NM_170600.1	0.001	0.66
DKFZp762E1312	ILMN_137041	NM_018410.2	0.001	0.66
CCR6	ILMN_8000	NM_031409.2	0.001	0.66
UBE2S	ILMN_7444	NM_014501.1	0.001	0.65
CCNA2	ILMN_16427	NM_001237.2	0.001	0.65
SGOL2	ILMN_743	NM_152524.3	0.001	0.65
PRC1	ILMN_20465	NM_003981.2	0.001	0.64
NEK2	ILMN_14211	NM_002497.2	0.001	0.64
FLJ22624	ILMN_5157	NM_024808.2	0.001	0.63
C15orf23	ILMN_28790	NM_033286.1	0.001	0.63
UBE2C	ILMN_6398	NM_181803.1	0.001	0.63
ERN1	ILMN_20244	NM_152461.2	0.001	0.62
KIF23	ILMN_11802	NM_004856.4	0.001	0.62
TROAP	ILMN_13141	NM_005480.2	0.001	0.62
CDCA2	ILMN_19331	NM_152562.2	0.001	0.61
DEPDC1	ILMN_25582	NM_017779.3	0.001	0.60

Symbol	TargetID	Accession	Adjusted p-value	Fold change
C9orf140	ILMN_24887	NM_178448.2	0.001	0.60
CDCA8	ILMN_13462	NM_018101.2	0.001	0.59
BUB1	ILMN_10590	NM_004336.2	0.001	0.59
CCDC58	ILMN_27140	NM_001017928.2	0.001	0.59
CCNB2	ILMN_15254	NM_004701.2	0.001	0.58
CCNF	ILMN_27253	NM_001761.1	0.001	0.58
KIF14	ILMN_29781	NM_014875.1	0.001	0.57
CENPF	ILMN_8225	NM_016343.3	0.001	0.56
MYC	ILMN_28130	NM_002467.3	0.001	0.55
ASPM	ILMN_408	NM_018136.2	0.001	0.54
HMMR	ILMN_16900	NM_012485.1	0.001	0.54
PLK1	ILMN_1127	NM_005030.3	0.001	0.50
CENPE	ILMN_7509	NM_001813.2	0.001	0.49
DLG7	ILMN_4880	NM_014750.3	0.001	0.48
CCNB1	ILMN_10005	NM_031966.2	0.001	0.47
PSRC1	ILMN_1748	NM_001005290.2	0.001	0.46
STK6	ILMN_12352	NM_198434.1	0.001	0.45
CENPA	ILMN_5449	NM_001809.2	0.001	0.44
KLF2	ILMN_9994	NM_016270.2	0.001	0.43
KIF20A	ILMN_14100	NM_005733.1	0.001	0.43
CDC20	ILMN_8354	NM_001255.1	0.001	0.42

Erfolgskontrollbericht : FuE Vorhaben StSch 4467

„Molekulare Biomarker für zelluläre und klinische Strahlenempfindlichkeit“

1.) Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Kenntnisse über individuelle Strahlenempfindlichkeit sind sowohl für die Bewertung von Strahlenrisiken als auch für eine optimale Strahlentherapie sehr wichtig. Der Behandlungserfolg einer Strahlentherapie ist z.B. von der applizierten Dosis und vielen anderen Parametern abhängig. Eine frühe Erkennung durch *in vitro*-Tests an einfach zugänglichem Patientenmaterial ist daher höchst wünschenswert. Jedoch konnten bisher keine eindeutigen Biomarker identifiziert werden, die eine Erkennung von strahlenempfindlichen Individuen ermöglichen.

2.) Wissenschaftliche Ergebnisse und wesentliche Erfahrungen des Vorhabens

a.) Um eine optimale Bioprobenqualität für funktionelle Analysen zu gewährleisten, wurden primäre Lymphozyten direkt nach der Blutentnahme isoliert. Jedoch zeigt die Bestimmung der Anfangsnekrose im Rahmen der Apoptosemessungen, dass bereits im Ausgangsmaterial ohne Behandlung erhebliche Unterschiede in der Anzahl lebender Zellen vorlagen. In einigen Proben lag der Anteil an nekrotischen Zellen bei über 90%, was eine Verwendung dieser Proben nur unter Vorbehalt zulässt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit einer qualitativ hochwertigen Probenaufarbeitung und Verteilung für funktionelle Analysen in weiteren Studien.

b.) Durch Harmonisierung der Protokolle konnte eine gute Standardisierung der Versuchsprotokolle zwischen den einzelnen Labors erzielt werden und diese durch Mitführung interner Standard-Proben kontrolliert werden.

c.) Mit den im Vorhaben angewendeten Assays konnten innerhalb des Probenkollektivs deutliche interindividuelle Unterschiede bezüglich DNA-Reparaturkapazität und Apoptoseinduktion nach ionisierender Bestrahlung nachgewiesen werden. Stichprobenartige Wiederholungen zeigten dabei eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb der Ergebnisse der einzelnen Labors.

d.) Mit den angewendeten Verfahren war eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisbar.

e.) In einzelnen Untersuchungen konnte zwar eine Korrelation zwischen *in vitro*-Daten und den klinischen Befunden festgestellt werden. So konnte z.B. bei den am

Helmholtz-Zentrum München durchgeführten Untersuchungen in den primären Proben von normal strahlenempfindlichen gegenüber überempfindlichen Patienten sowohl eine höhere Induktion der H2AX-Phosphorylierung als auch eine höhere Apoptoseinduktion bei 0,8 Gy gemessen werden. Dazu passend zeigten auch die Zell-Linien von normal strahlenempfindlichen Spendern eine höhere H2AX-Phosphorylierung als Zell-Linien von strahlenüberempfindlichen Spendern. Eine statistische Signifikanz beim Vergleich der Labor-Ergebnisse mit den beobachteten klinischen Ausprägungen konnte jedoch für keinen der eingesetzten zellulären Tests gezeigt werden. D.h. ein eindeutiger Marker zur Identifizierung strahlenüberempfindlicher Patienten konnte am vorhandenen Kollektiv im Rahmen dieses Projektes weder mit dem Comet-Assay, noch mit der Bestimmung von γ-H2AX oder der Induktion von Apoptose gefunden werden.

f.) Im Interlaborvergleich zeigten sich bei allen drei zellulären Testverfahren trotz weitreichender Harmonisierung der Laborprotokolle große Unterschiede und damit nur sehr geringe Korrelationen der gemessenen Einzelwerte.

g.) Durch die genomweite Expressionsanalyse mittels Microarrays konnten Markergene identifiziert werden, die sich in primären Lymphozyten des vorhandenen Patienten-Kollektivs in ihrer Strahlenreaktion in strahlenüberempfindlichen und normal reagierenden Patienten unterscheiden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines prädiktiven Tests müssen diese Befunde nachfolgend in einem größeren Kollektiv validiert werden.

h.) Der Vergleich zwischen primären und immortalisierten Zellen zeigt bei allen untersuchten Endpunkten, dass sich die beiden Zellsysteme deutlich voneinander unterscheiden und die EBV transformierten Zell-Linien nur bedingt für mechanistische Untersuchungen zur klinischen Strahlenempfindlichkeit geeignet sind. Lymphoblastoide Zellen sind nach den vorliegenden Daten nicht als Ersatz für die fragilen primären Lymphozyten geeignet.

3.) Fortschreibung des Verwertungsplans

Zum jetzigen Zeitpunkt des Projekts sind keine Erfindungs-/Schutzanmeldungen geplant. Die bisherigen Ergebnisse stellen jedoch eine sehr gute Ausgangsbasis für weitere Analysen dar und werden für weitergehende Forschungsprojekte genutzt

werden. Hierbei sollte vor allem eine Vergrößerung des Patientenkollektivs angestrebt werden.

4.) Arbeiten, die zu keinen Lösungen geführt haben

Laut Antrag sollte jeweils primäres Patientenmaterial parallel zu den korrespondierenden immortalisierten Zell-Linien untersucht werden. Bei der Bestimmung der Apoptose mittels AnnexinV-Assay war eine Unterscheidung von lebenden und apoptotischen EBV transformierten Zellen per FACS nicht möglich. Alternative Methoden konnten im Rahmen dieses Antrages aus Zeitgründen nicht eingesetzt werden.

5.) Präsentationsmöglichkeiten

Die erhobenen Befunde werden sowohl auf internationalen Fachkongressen als auch durch Publikationen in geeigneten Fachzeitschriften veöffentlicht. Die Ergebnisse werden zudem von den verantwortlichen Projektteilnehmern beim BfS vorgestellt. Alle Abbildungen werden als Powerpoint oder pdf-File zur Verfügung gestellt.

6.) Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung

a) Zeitplan

Durch Verzögerungen bei der Zell-Linien-Herstellung stand das Gesamt-Kollektiv der Proben erst ca. 3 Monate später als zunächst geplant allen teilnehmenden Gruppen zur Verfügung. Es konnte daher mit einem Teil der experimentellen Arbeiten erst mit mehrwöchiger Verzögerung begonnen werden. Die Laufzeit des Projektes wurde daher um 3 Monate kostenneutral verlängert. Die experimentellen Messungen konnten somit alle im angepassten Zeitfenster durchgeführt und abgeschlossen werden. Die in Aussicht gestellte, zusätzliche mikroskopische Analyse des γH2AX-Assays wurde aufgrund des enormen Zeitaufwandes in Absprache mit dem Zuwendungsgeber und dem Helmholtz Zentrum München nicht durchgeführt.

b) Finanzplan

Der Finanzplan wurde aufgrund reduzierter Personalkosten in Jena und Münster unterschritten.

Der Beginn des Projektes am Universitätsklinikum Münster musste zeitverzögert

erfolgen, da die schriftlichen Vereinbarungen über das Forschungsprojekt das Klinikum in einem engen zeitlichen Fenster vor geplantem Beginn der Aufnahme des Projektes erreichten. Aus diesem Grund konnte die ab Beginn vorgesehene halbe Arztstelle nur zeitverzögert besetzt werden. Die Arztstelle mit der Hälfte der regulären Arbeitszeit (1/2 BAT IIa-Stelle) wurde zum 01.01.2006 besetzt. Da aus diesem Grund die Patienteneinbestellung und Koordination ebenfalls verzögert wurde, war auch eine Teilverlagerung der Kosten für die Aufwandsentschädigung der Patienten sowie für die Versendung der Proben auf Trockeneis in das erste Quartal 2006 nötig. Eine Auswirkung auf das Gesamtprojekt stellte sich nicht ein, da die Harmonisierung der Versuchsprotokolle ebenfalls längere Zeit in Anspruch nahm. Die Patientenproben konnten dann annähernd gemäß Zeitvorgaben akquiriert werden.

Ab Dezember 2006 war die Einstellung einer Statistikerin mit der Hälfte der wöchentlichen Arbeitszeit zur Auswertung der erhobenen klinischen Daten und später auch der Laborparameter geplant. Da die fest eingeplante Statistikerin, die bereits im StSch-Vorprojekt in Münster tätig gewesen war, leider kurzfristig nicht mehr zur Verfügung stand, war die Besetzung fristgerecht nicht mehr möglich. Wir konnten aber über das Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik (IMIB) am Universitätsklinikum Münster eine neue Statistikerin für diese Stelle gewinnen. Die Einstellung erfolgte zeitverzögert zum 01.02.2007. Aufgrund der Umwandlung von BAT IIa-Tarifen in den TV-L sowie der initialen Unklarheit für die Eingruppierung innerhalb des BAT (Orts-/Familienzuschlag) entstand ein geringerer Bedarf für Personalmittel für die halbe BAT-IIa-Statistik-Stelle als initial beantragt. Auf der anderen Seite fielen durch häufigere Projekttreffen in München, für die seitens des BfS mehrere Teilnehmer aus Münster, insbesondere von der Statistik, aktiv angefordert wurden, deutlich höhere Reisekosten als initial beantragt an. Zusätzlich waren die Reisekosten für die Gruppe in Münster aufgrund der mit Abstand deutlich längsten Entfernung nach München als höher anzusetzen, so dass eine Kostenumverteilung von Personalmitteln zu Reisemitteln beantragt wurde. Die beantragten Verbrauchsmittel wurden gemäß Antrag verbraucht.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:
Bundesamt für Strahlenschutz
Postfach 10 01 49
38201 Salzgitter
Telefon: + 49 30 18333 - 0
Telefax: + 49 30 18333 - 1885
Internet: www.bfs.de
E-Mail: ePost@bfs.de
Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.

Bundesamt für Strahlenschutz