

# Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

## Untersuchungen zu genetischen Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit in Lungenkrebsfamilien – Vorhaben 3605S04454

Auftragnehmer:

Universität München, Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie  
in Zusammenarbeit mit:

\*Universität Göttingen, Abteilung für Genetische Epidemiologie

Wiebke Sauter

Albert Rosenberger\*

Heike Bickeböller\*

Hans-Erich Wichmann

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

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-24/09**

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:  
**urn:nbn:de:0221-2009100619**

Salzgitter, Dezember 2009

# Schlussbericht

des Forschungsvorhabens 3605S04454

## **„Untersuchung zu genetischen Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit in Lungenkrebsfamilien“**

Vertrag zwischen BfS und LMU - München

(Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie,  
Prof. Dr. Dr. H.-Erich Wichmann)

in Zusammenarbeit mit der Universitätsmedizin Göttingen

(Abteilung für Genetische Epidemiologie, Prof. Dr. Heike Bickeböller)

### **Laufzeit**

|              |                         |
|--------------|-------------------------|
| Planung      | 01.05.2005 – 31.07.2005 |
| Durchführung | 01.08.2005 – 30.04.2008 |
| Verlängerung | 01.05.2008 – 30.11.2008 |



## Inhaltsverzeichnis

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>I.</b>    | <b>Kurzfassung</b>   | <b>7</b>  |
| <b>II.</b>   | <b>Kurzdarstellung der Vorgaben</b>  | <b>9</b>  |
| <b>II.1</b>  | <b>Aufgabenstellung</b>  | <b>9</b>  |
| <b>II.2</b>  | <b>Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde</b>   | <b>10</b> |
| <b>II.3</b>  | <b>Planung und Ablauf des Vorhabens</b>  | <b>11</b> |
| II.3.1.      | Auswahl von Kandidatengen und genomischen Marker   | 11        |
| II.3.2.      | Definition der Familien und Ermittlung der Kohortengröße der Untersuchung  | 15        |
| II.3.3.      | Lymphozytenpräparation und Immortalisierung  | 19        |
| II.3.4.      | Genetische Analyse der Polymorphismen  | 19        |
| II.3.5.      | Strahlensensitivitätsanalyse mit dem COMET-Assay   | 20        |
| <b>II.4</b>  | <b>Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde</b>   | <b>23</b> |
| II.4.1.      | Genomische Instabilität, Strahlensensitivität, Lungenkrebs, Genmutationen und niedrig penetrante Genpolymorphismen | 23        |
| II.4.2.      | Strahlenempfindlichkeit, Lungenkrebs und Heritabilität   | 24        |
| II.4.3.      | Biologie der DNA-Reparatur, Kandidaten-Gene und Kandidaten-SNPs  | 24        |
| II.4.4.      | Base Excision Repair (BER) Reparatur   | 25        |
| II.4.5.      | Non Homologous End Joining (NHEJ)  | 26        |
| II.4.6.      | Fehlpaarungsreparatur (MissMatchRepair) und Apoptose   | 29        |
| <b>II.5</b>  | <b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>  | <b>31</b> |
| <b>III.</b>  | <b>Eingehende Darstellung der einzelnen Projekte</b>   | <b>32</b> |
| <b>III.1</b> | <b>Bioprobenbank LCL</b>   | <b>32</b> |
| <b>III.2</b> | <b>Messung der Strahlungsschädigung und DNA-Reparaturkapazität im COMET-Assay</b>                                  | <b>33</b> |
| III.2.1.     | Auswertbarkeit und Verwertbarkeit der Einzelexperimente  | 33        |
| III.2.2.     | Qualitätskontrolle und Validierung der Messungen   | 37        |
| <b>III.3</b> | <b>Genotypisierung</b>   | <b>48</b> |
| III.3.1.     | Prüfung der Mendelschen Segregation der Familien   | 48        |
| III.3.2.     | Beschreibung der genetischen Marker  | 50        |
| III.3.3.     | Blöcke mit erhöhtem LD (Kopplungsungleichgewicht) der genetischen Marker   | 50        |
| <b>III.4</b> | <b>Fall-Kontroll-Studie</b>  | <b>52</b> |
| III.4.1.     | Methoden   | 52        |
| III.4.2.     | Beschreibung der Studienpopulation   | 53        |
| III.4.3.     | Ergebnisse   | 56        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III.5 Familienstudie.....</b>  | <b>68</b> |
| III.5.1. Methoden .....   | 68        |
| III.5.2. Beschreibung der Studienpopulation.....  | 69        |
| III.5.3. Ergebnisse.....  | 75        |
| <b>III.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse .....</b>                                  | <b>84</b> |
| <b>III.7 Voraussichtlicher Nutzen bzw. Verwertbarkeit der Ergebnisse .....</b>                    | <b>89</b> |
| <b>III.8 Fortschritte im Forschungsgebiet während der Durchführung des FE-<br/>Vorhabens.....</b> | <b>89</b> |
| <b>III.9 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen.....</b>  | <b>90</b> |
| <b>IV. Erfolgskontrollbericht : FuE Vorhaben StSch 4454 _____</b>                                 | <b>91</b> |
| <b>IV.1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des<br/>Förderprogramms .....</b>  | <b>91</b> |
| <b>IV.2 Wissenschaftliche Ergebnisse und wesentliche Erfahrungen des<br/>Vorhabens.....</b>       | <b>91</b> |
| IV.2.1. Bioprobenbank LCL .....   | 91        |
| IV.2.2. Interne Validierung der Zielgrößen des COMET-Assay.....                                   | 91        |
| IV.2.3. Genotypisierungen von Kandidatengenomen für Strahlenempfindlichkeit .....                 | 91        |
| <b>IV.3 Erfindungs-/Schutzanmeldungen, Fortschreibung des Verwertungsplans .....</b>              | <b>92</b> |
| <b>IV.4 Arbeiten, die zu keinen Lösungen geführt haben.....</b>                                   | <b>92</b> |
| <b>IV.5 Präsentationsmöglichkeiten.....</b>   | <b>92</b> |
| <b>IV.6 Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung.....</b>  | <b>92</b> |
| IV.6.1. Zeitplan .....  | 92        |
| IV.6.2. Finanzplan .....  | 92        |
| <b>V. Literatur _____</b>   | <b>93</b> |

## Tabellenverzeichnis

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1.  | Genotypisierte Marker aus ausgewählten DNA- Reparatur-Genen .....   | 13 |
| Tabelle 2:  | notwendige Stichprobengröße der (Fall-Kontroll-Studie .....   | 15 |
| Tabelle 3:  | Studienteilnehmer der LUCY-Studie .....   | 17 |
| Tabelle 4:  | Definition der Priorität verschiedener Familientypen .....  | 18 |
| Tabelle 5:  | Anzahl verfügbarer Familien gemäß Prioritätenliste.....   | 19 |
| Tabelle 6:  | PCR-Bedingungen .....   | 20 |
| Tabelle 7   | Basenextensionsreaktion-Bedingungen.....  | 20 |
| Tabelle 8:  | Übersicht LCL (Lymphozyten Zelllinien).....   | 32 |
| Tabelle 9   | Übersicht: Auswertbarkeit und Designmängel vs. Fragestellungen.....   | 34 |
| Tabelle 10  | Übersicht: Zusammensetzung der Studienpopulation .....  | 35 |
| Tabelle 11  | Auswertbarkeit der Einzelexperimente .....  | 36 |
| Tabelle 12: | Trend innerhalb eines Barcodes: p-Werte .....   | 38 |
| Tabelle 13: | zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes: .....   | 43 |
| Tabelle 14: | Anrechenbare Anteil der beobachteten Variabilität in den Messwerten.....  | 44 |
| Tabelle 15: | Glättungsanalyse: p-Werte für lnTOM und logit %DNA .....  | 45 |
| Tabelle 16  | Callrate pro Person .....   | 49 |
| Tabelle 17  | Gründe für Ausfall bei Genotypisierung .....  | 49 |
| Tabelle 18  | Beschreibung der Studienteilnehmer: Alter, Geschlecht und<br>Rauchverhalten .....                                   | 54 |
| Tabelle 19  | Beschreibung der Studienteilnehmer: Strahlenempfindlichkeit.....  | 55 |
| Tabelle 20  | Rangkorrelation der Zielgrößen zur Strahlenempfindlichkeit: Fall-<br>Kontroll-Studie .....                          | 57 |
| Tabelle 21  | Strahlenempfindlichkeit als Prädiktoren für Lungenkrebs.....  | 57 |
| Tabelle 22  | Signifikante genetische Assoziation mit Lungenkrebs (p<0.05).....   | 59 |
| Tabelle 23: | Übersicht Signifikanzen für Alter, Geschlecht und Krankheitsstatus .....  | 61 |
| Tabelle 24: | Signifikante genetische Marker (p<0,05): co-dominantes Modell.....  | 62 |
| Tabelle 25  | FDR für genetische Marker (p<0,05): co-dominantes Modell.....   | 63 |
| Tabelle 26  | Familientyp (Priorität) der in der Studie analysierten Familien .....   | 70 |
| Tabelle 27: | Übersicht signifikanz für den Einfluss von Alter, Geschlecht und<br>pack years auf die Strahlenempfindlichkeit..... | 72 |
| Tabelle 28  | Beschreibung der Studienteilnehmer: Alter, Geschlecht und<br>Rauchverhalten .....                                   | 73 |
| Tabelle 29  | Beschreibung der Studienteilnehmer: Strahlenempfindlichkeit.....  | 74 |
| Tabelle 30: | Schätzung der Pseudo-Heritabilität .....  | 75 |
| Tabelle 31  | geschätzte (nominale) Heritabilität $\hat{h}_{\text{nominale}}^2$ .....   | 76 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 32  | korrigierte Heritabilität $\hat{h}^2$ .....   | 77 |
| Tabelle 33: | Signifikante häufige/seltene Transmission des selteneren Allels an LK-Patienten (RC-TDT): $p < 0,05$ .....        | 80 |
| Tabelle 34: | FBAT: Test Assoziation zu Strahlenempfindlichkeit: signifikante genomisch Marker ( $p < 0.05$ ): lnTOM .....      | 82 |
| Tabelle 35: | FBAT: Test Assoziation zu Strahlenempfindlichkeit: signifikante genomisch Marker ( $p < 0.05$ ): logit %DNA ..... | 83 |

## Abbildungsverzeichnis

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1:  | Maße der DNA-Schädigung am Bilde einer Zelle im COMET-Assay .....   | 21 |
| Abbildung 2:  | Verlauf der Zellvermessung (schematische Darstellung).....  | 37 |
| Abbildung 3:  | Trend innerhalb eines Barcodes: Korrelation der p-Werte für lnTOM und logit %DNA .....  | 38 |
| Abbildung 4:  | Wartezeit bis zur Vermessung: lnTOM.....  | 39 |
| Abbildung 5:  | Vermessungsdauer eines Einzelerperiments: lnTOM.....  | 40 |
| Abbildung 6:  | Anzahl vermessener Zellen: lnTOM .....  | 41 |
| Abbildung 7:  | zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes.....   | 42 |
| Abbildung 8:  | Glättungsanalyse: Spline-Schätzer für Vermessungsdauer, Tag der Vermessung, Anzahl nicht vermessener Zellen und Position: lnTOM .....     | 46 |
| Abbildung 9:  | Glättungsanalyse: Spline-Schätzer für Vermessungsdauer, Tag der Vermessung, Anzahl nicht vermessener Zellen und Position: logit%DNA ..... | 47 |
| Abbildung 10: | Verlauf der DNA-Schadens: Vergleich von Fällen und Kontrollen.....  | 55 |
| Abbildung 11: | Verlauf der DNA-Reparaturkapazität: Vergleich von Fällen und Kontrollen.....  | 60 |
| Abbildung 12: | Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs2237060 (RAD50).....   | 64 |
| Abbildung 13: | Genotypischer Basisschaden: rs2237060 (RAD50) .....   | 64 |
| Abbildung 14: | Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs1193693 (XRCC4) .....  | 65 |
| Abbildung 15: | Genotypischer Basisschaden: rs13447623 (MRE11A) .....   | 65 |
| Abbildung 16: | Genotypischer Basisschaden: rs659349 (MRE11A) .....   | 66 |
| Abbildung 17: | Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs4608577 (MSH2).....  | 66 |
| Abbildung 18: | Genotypischer Basisschaden: rs4608577 (MSH2).....   | 67 |
| Abbildung 19: | Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs2317130 (TGFB1) .....  | 67 |
| Abbildung 20: | Verlauf der DNA-Schadens: Vergleich der Verwandtschaftsgruppen.....   | 71 |
| Abbildung 21: | Spline-Effekt des Alters auf den Basisschaden .....   | 72 |
| Abbildung 22: | Schätzung des Fehlers der Heritabilitätsschätzung .....   | 76 |
| Abbildung 23: | Parent-Offspring Regression .....   | 78 |

# I. Kurzfassung

## *Hintergrund*

---

Es gibt Hinweise dafür, dass Personen mit Lungenkrebs in jungem Alter ein instabileres Genom haben als die durchschnittliche Bevölkerung (Kreuzer et al. 1999). Daher sollte geprüft werden, ob diese Personen und ihre Familien eine höhere Suszeptibilität gegenüber Strahlung aufweisen. So ist die Erkrankungsrate an Lungenkrebs bei den Personen, die einer geringen Strahlendosis, wie zum Beispiel durch das Edelgas Radon, ausgesetzt waren, erhöht (Kreuzer et al. 1999). Deswegen wurden junge Lungenkrebsfälle unter 50 Jahren (LUCY) und gematchte Kontrollen aus der populationsbasierten KORA-Studie als Untersuchungsgruppe ausgewählt. Zusätzlich wurden die Familien der jungen Lungenkrebspatienten einbezogen.

## *Projektziel*

---

Das Ziel des Projektes war die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit in Familien von jung an Lungenkrebs Erkrankten, sowie ein Vergleich dieser mit der deutschen Bevölkerung. Polymorphismen in DNA Reparatur-Genen, die mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit korrelieren, sollten identifiziert werden.

## *Methode*

Es wurden parallel zwei Untersuchungsansätze verfolgt, zum einen eine Fall-Kontroll-Studie, die 183 inzidente junge Lungenkrebspatienten (jünger als 51 Jahre) der LUCY-Studie und 169 Alters- und Geschlechts- gematchte Kontrollen aus der populationsbasierten KORA-Studie umfasst, und zum anderen eine Familienstudie mit 254 Mehrgenerationen-Familien (insgesamt 787 Personen), die innerhalb der LUCY-Studie rekrutiert wurden.

Genotypen an 52 SNPs in 12 ausgewählten DNA Reparatur-Genen wurden mit der MALDI-TOF-Methode bestimmt. Die individuelle *in vitro* Strahlenempfindlichkeit von primären Lymphozyten wurde mittels COMET-Assay gemessen. Als Zielgrößen wurde sowohl das log-transformierte Tail Olive Moment (lnTOM) als auch der logit-transformierte Anteil DNA im „Kometenschweif“ (logit %DNA) betrachtet. Damit wurden ein Basisschaden (Schädigung ohne Bestrahlung), ein strahlungsinduzierter Initialschaden (Schädigung direkt nach Bestrahlung mit 4 Gy), sowie die DNA Reparaturkapazität (DRC) nach 10, 30 und 60 Minuten bestimmt.

## *Ergebnisse (derzeit nur stichwortartig)*

---

Die DNA Reparaturkapazität nach 30 Minuten, bemessen am lnTOM, zeigten sich als signifikanter Prädiktor für Lungenkrebs in jungen Jahren ( $p=0.0445$ ). Je 10% geringere  $DRC_{30\text{ Minuten}}$  steigt die Chance an Lungekrebs zu erkranken um das 1.16-fache (95%-CI: 1,00 – 1.33). Der Einfluss der Reparaturkapazität auf das Risiko einer Lungenkrebserkrankung entspricht etwa dem von 10 packyears, rund der mittleren Rauchexposition unter den Kontrollen.

Die Höhe des Basis- und des strahleninduzierten Initialschadens unter Kontrollpersonen erwies sich als durch Alter und Geschlecht mitbestimmt. Unter den Fällen konnten diese Ein-

flüsse nicht oder nur deutlich abgemildert beobachtet werden. Fälle unterscheiden sich ferner von Kontrollen - zumindest bemessen am lnTOM – in der Reparaturfähigkeit. 60 Minuten nach Bestrahlung bestand unter LK-Patienten noch ein 10%iger Restschaden, wohingegen unter Kontrollen die Reparatur abgeschlossen war.

Das Gen hOGG1 des BER – Reparaturweges (Base Excision Repair), und die Gene LIG4, MRE11A, XRCC4 und PCNA aus dem NHEJ – Reparaturweg (Non Homologous End Joining) zeigten sich in der Fall-Kontrollstudie als signifikant mit einer Lungenkrebserkrankung assoziiert.

Drei Marker aus zwei Genen (hOOG1 und XRCC1) des BER- Reparaturweges, und drei Marker aus zwei Genen (PCNA und MRE11A) des NHEJ- Reparaturweges zeigten in der Familienstudie ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht im RC-TDT.

Bei 12 der 52 untersuchten SNPs zeigte sich bei mindestens einem Marker eine signifikante Assoziation je Schaden (Basis- oder strahleninduzierter Initialschaden oder zur Reparatur nach 30 Minuten) und Zielgröße (lnTOM oder logit %DNA). Dies betraf im Besonderen RAD50, XRCC4 und MRE11A des NHEJ – Reparaturweges, MSH2 des MMR – Reparaturweges (Miss Match Repair) und das Apoptose-Gen TGFB1.

Sowohl mittels lnTOM als auch mittels logit %DNA konnte eine **Heritabilität von ~77%** (95%-CI: 63%-91%) für den **Basisschaden** geschätzt werden. Eine ähnlich hohe Heritabilität (75%; 95%-CI: 62%-88%) ergibt sich für den strahlungsinduzierter Initialschaden , bemessen am lnTOM.

### Zusätzliche Projektaufgabe

---

Zusätzlich wurde eine Bioprobenbank für lymphoblastoide Zelllinien von 758 Personen aus 217 Familien, darunter 32 3-Generationenfamilien, angelegt, die nach Projektende dem BfS für die Untersuchungen von Fragen zu Strahlenrisiken durch andere Projektnehmer zur Verfügung gestellt werden kann.

### II. Kurzdarstellung der Vorgaben

Das Ziel des Projektes war die Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit in Familien von jung an Lungenkrebs Erkrankten, sowie ein Vergleich dieser Patienten mit der deutschen Bevölkerung. Polymorphismen in DNA Reparatur-Genen, die mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit korrelieren, sollten identifiziert werden. Zusätzlich sollte eine Bioprobenbank für lymphoblastoide Zelllinien angelegt werden, die nach Projektende dem BfS für Untersuchungen von Fragen zu Strahlenrisiken durch andere Projektnehmer zur Verfügung gestellt werden kann.

#### II.1 Aufgabenstellung

Genetische Polymorphismen, die gleichzeitig mit einer *in vitro* Strahlenempfindlichkeit und dem Phänotyp Lungenkrebs korrelieren, sollten identifiziert werden. Hierzu wurden aus dem Blut junger Lungenkrebspatienten und deren teilweise zu rekrutierenden Familienangehörigen DNA und primäre Lymphozyten isoliert und EBV transformierte Zelllinien angelegt. In diesen Familien sollten ausgewählte Polymorphismen von Kandidatengen bestimmt und mit der Strahlenempfindlichkeit, gemessen mittels COMET-Assay, korreliert werden. Dieselben genetischen Polymorphismen wurden ebenso in einer Stichprobe nicht an Krebs Erkrankter bestimmt. Korrelationen bzw. Assoziationen dieser experimentellen Daten mit verfügbaren Daten aus einer Bioproben/Datenbank (s. u.) erfolgten mit Hilfe statistischer Modelle.

Im Einzelnen sollte folgenden Problemstellungen nachgegangen werden:

- Untersuchung der Heritabilität der Strahlenempfindlichkeit (B.2)
- Untersuchung genetischer Polymorphismen in mindestens zwölf ausgesuchten Kandidatengen als Fall-Kontroll-Studie (B.3)
- Untersuchung genetischer Polymorphismen in mindestens zwölf ausgesuchten Kandidatengen als Familienstudie (B.4)
- Korrelation der gewonnenen Daten (Genotypisierung, Strahlenempfindlichkeit) mit den vorliegenden Daten der Bioproben/Datenbank (Lungenkrebsstatus, Verwandtschaftsbeziehung, Raucheranamnese, Alter, Geschlecht) (B.5)

Eine zusätzliche Aufgabenstellung war die

- Immortalisierung der Lymphozyten von den Lungenkrebspatienten mit Familienangehörigen plus Familienmitglieder [B.1]
- Nachrekrutierung und Dateneingabe [A.3]

## **II.2 Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde**

Grundvoraussetzung für die Untersuchungen waren das Vorhandensein von Biomaterial sowie etablierte molekularbiologische und statistische Untersuchungstechniken. Das Biomaterial stammte zum einen von jungen, neu diagnostizierten, kaukasischen Lungenkrebspatienten (LUCY = LUnG Cancer of the Young), sowie deren Familienangehörigen. Lungenkrebspatienten ohne Familienangehörige wurden einer Stichprobe krebsfreier kaukasische Teilnehmer der KORA-Studie des Helmholtz Zentrums München, Institut für Epidemiologie unter Leitung von Prof. Dr. H.-Erich Wichmann, gegenübergestellt.

Ergänzend zu den genetischen Untersuchungen wurden am BfS an beiden Kohorten Untersuchungen der Strahlenempfindlichkeit mit dem COMET-Assay an primären Lymphozyten durchgeführt und eine Bioprobenbank von mit EBV immortalisierten Lymphozyten angelegt.

Es wurden daher parallel zwei Untersuchungsansätze verfolgt, zum einen eine Fall-Kontroll-Studie, die 183 junge Lungenkrebspatienten aus der LUCY-Studie und 169 Alters und Geschlechts gematchte Kontrollen aus der populationsbasierten KORA-Studie umfasste und zum anderen eine Familienstudie mit 254 Mehrgenerationen-Familien (insgesamt 787 Personen) die innerhalb der LUCY-Studie rekrutiert wurden.

### *LUCY-Studie*

---

LUCY (LUnG Cancer in the Young) ist eine fortlaufende multizentrische Studie zum jungen Lungenkrebs mit 31 rekrutierenden Krankenhäusern in ganz Deutschland. Blutproben werden genommen und DNA, primäre Lymphozyten und Zelllinien werden von nahezu allen Teilnehmern gewonnen. Bis heute wurden etwa 800 junge Patienten (<51 Jahre) und 1400 Verwandte rekrutiert.

Erfasst sind in der Datenbank Lungenkrebspatienten, die bei Diagnosestellung 50 Jahre oder jünger waren. Diese wurden über alle Familienangehörige ersten Grades befragt, d.h. Eltern, Geschwister, Kinder über 18 Jahre, Partner als biologische Eltern der erfassten Kinder. Im Rahmen der LUCY-Studie wurden bereits Eltern und Geschwister rekrutiert und das vorhandene Familienmaterial tabellarisch aufgearbeitet. Detaillierte epidemiologische Daten zu Krankengeschichte, Krebs in der Familie, Rauchgewohnheiten und beruflichen Risikofaktoren stehen innerhalb dieser Population zur Verfügung.

LUCY wird vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Epidemiologie unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Wichmann und der Abteilung Genetische Epidemiologie der Universitätsmedizin Göttingen unter Leitung von Frau Prof. Dr. Bickeböller, durchgeführt.

### *Die KORA-Studie*

---

Das Helmholtz Zentrum München hat die populationsbasierte KORA-Plattform entwickelt (KORA= Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg). Bisher wurden vier Surveys zwischen 1984/85 und 1999/2001 durchgeführt. Insgesamt stehen

verschiedene phänotypische, medizinische, Labor- und Interviewdaten von 18000 Studienteilnehmern, im Alter zwischen 25 und 74 Jahren bei ihrer ersten Vorstellung, zur Verfügung. Von etwa 12000 Probanden ist auch DNA verfügbar. Weiterhin wurden 1600 EBV immortalisierte Zelllinien etabliert. KORA ist eine gut untersuchte und für Kaukasier genetisch repräsentative deutsche Population.

Für alle Studienteilnehmer existiert eine Einverständniserklärung. Die Studien wurden durch die Bayerische Landesärztekammer und die lokal zuständigen Ethikkommissionen der lokalen Kliniken freigegeben.

Weitere Voraussetzungen für die durchgeführten Untersuchungen waren etablierte Methoden zur Isolation primärer Zellen, zur EBV Transformation, zur Genotypisierung sowie zur Bestimmung der *in vitro* Strahlenempfindlichkeit mit den COMET-Assay.

### **II.3 Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Projekt gliederte sich in Planungsphase und Durchführungsphase. Die Planungsphase beinhaltete die Auswahl von Kandidatengen und Single Nucleotid Polymorphismen, die Definition der Familien und die Berechnung der statistischen Power der Untersuchungen. Die Durchführungsphase beinhaltete sämtliche geplante Laboruntersuchungen sowie die Auswertung der erhobenen Projektdaten.

Die Planungsphase war in die folgenden Teilaufgaben gegliedert

- A.1 Auswahl von zunächst 6 Kandidatengen
- A.2 Definition der Familien und Berechnung der statistischen Power der Untersuchungen
- A.3 Bestandsaufnahme der Familiendaten und –proben zum Zeitpunkt des Vertragsbeginns. Festlegung der Nachrekrutierung, Dateneingabe und Immortalisierung

Die Durchführungsphase war gegliedert in die folgenden Teilaufgaben

- B.1 Untersuchung der Heritabilität der Strahlenempfindlichkeit
- B.2 Untersuchung genetischer Polymorphismen in zunächst sechs ausgesuchten Kandidatengen als Fall - Kontroll-Studie
- B.3 Untersuchung genetischer Polymorphismen in mindestens sechs ausgesuchten Kandidatengen als Familienstudie
- B.4 Korrelation der gewonnenen Daten (Genotypisierung, Strahlenempfindlichkeit) mit den vorliegenden Daten der Bioproben/Datenbank (Lungenkrebsstatus, Verwandtschaftsbeziehung, Raucheranamnese, Alter, Geschlecht)
- B.5 Immortalisierung von Lymphozyten der Lungenkrebspatienten mit Familienangehörigen plus Familienmitglieder (Anlegen von Zelllinien von 120 Familien, davon 100 Zwei-Generationen-Familien und 20 Drei-Generationen-Familien mit insgesamt mindestens 500 Familienangehörigen)

Durch Vertragsänderung wurde die Auswahl später auf zwölf Kandidatengene erhöht.

#### **II.3.1. Auswahl von Kandidatengen und genomischen Marker**

Die Auswahl von Kandidatengen, die im Zusammenhang mit Strahlenempfindlichkeit diskutiert werden, beschränkte sich auf DNA-Varianten, die potentiell mit einer *in vitro* Strahlenempfindlichkeit (DNA-Reparaturkapazität im COMET-Assay) oder mit Krebs assoziiert

sein könnten oder in der Fachliteratur bereits als assoziiert beschrieben wurden. Potentiell-funktionelle SNPs mussten dabei einem oder mehreren der folgenden Kriterien entsprechen:

1. Assoziationen: Für die DNA-Variante wurden Studienergebnisse mit positiver genetischer Assoziation mit Strahlenempfindlichkeit in der Fachliteratur publiziert bzw. diskutiert.
2. Potentielle Funktionalität: Der Polymorphismus hat einen Austausch von Aminosäuren in dem vom Gen kodierten Protein zur Folge oder beeinflusst auf andere Weise die Bildung des Proteins.
3. Häufigkeit: Die Allelhäufigkeit des selteneren Allels (MAF: minor allele frequency) in der mitteleuropäischen Bevölkerung sollte möglichst 20 % überschreiten, um für die zu untersuchenden Kohorten sowohl im Fall-Kontroll Ansatz als auch im Familien-Ansatz eine ausreichende Power zu erhalten. Bei in der Fachliteratur bereits diskutierte Markern entfällt diese Anforderung.

Zusätzlich wurden für alle zu untersuchenden Gene tagging-SNPs, die die blockweise LD-Struktur und somit die häufigsten Haplotypen der Gene bestmöglich repräsentieren, ausgewählt. Durch einen tagging-SNP können mehrere, miteinander korrelierte, d.h. hier im Kopplungsungleichgewicht (LD) stehende, DNA-Varianten repräsentiert werden. Bei der Auswahl geeigneter tagging-SNPs wurde auf die Datenbank des HapMap-Projekts zurückgegriffen. Die CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain)-Familien des Hap Map-Projektes dienen seit langem in der Genetik als etablierter Referenz (<http://www.cephb.fr/>). Verschiedene Studien konnten die Übertragbarkeit dieser Population auf mitteleuropäische Populationen bestätigen (Mueller et al. 2005; Benusiglio et al. 2005) insbesondere auch auf die in diesem Projekt verwendete KORA-Studienpopulation (Mueller et al. 2005). Die Identifizierung von tagging-SNPs im HapMap-Projekt war vergleichbar mit der Identifizierung von tagging-SNPs in weiteren europäischen Populationen (Benusiglio et al. 2005, Ke et al. 2005, de Bakker et al. 2005). Kriterien für die tagging-SNPs waren ein Kopplungsungleichgewicht LD von  $r^2 \geq 0,8$  und eine  $MAF \geq 20\%$ . Zur Selektion der tagging-SNPs wurde das gesamte Gen mit zusätzlichen 5000 bp upstream und downstream betrachtet.

Zur Genotypisierung wurden 70 genomische Marker aus 12 Kandidatengenen gemeinsam mit den Kooperationspartnern des BfS ausgewählt. Die Gene bzw. Marker können den Reparaturwegen (Pathways) Base Excision Repair (BER, 3 Gene, 15 Marker), Non Homologous End Joining (NHEJ, 6 Gene, 38 Marker, Miss Match Repair (MMR, 2 Gene, 12 Marker) und Apoptose (1 Gen, 5 Marker) zugeordnet werden.

## Kurzdarstellung des Vorhabens

**Tabelle 1. Genotypisierte Marker aus ausgewählten DNA- Reparatur-Genen**

| Name                                     | Struktur             | Lokation  | rs – Nr.   | Effekt / Information | Allele | MAF* | Bemerkung zur Genotypisierung |
|--|----------------------|-----------|------------|----------------------|--------|------|-------------------------------|
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |                      |           |            |                      |        |      |                               |
| hOGG1                                    | 7 Exons<br>8,13 kb   | 3p26.2    | rs1052133  | Ser326Cys            | C>G    | 0,27 | schlag fehl                   |
|  |                      |           | rs125701   | Promotor             | G>A    | 0,11 |                               |
|  |                      |           | rs2072668  | tagging-SNP          | C>G    | 0,24 |                               |
| XRCC1                                    | 17 Exons<br>32.25 kb | 19q13.2   | rs25487    | Arg399Gln            | G>A    | 0,28 | schlag fehl                   |
|  |                      |           | rs1001581  | tagging-SNP          | C>T    | 0,42 |                               |
|  |                      |           | rs2030404  | tagging-SNP          | A>G    | 0,42 |                               |
|  |                      |           | rs2682585  | tagging-SNP          | G>A    | 0,2  |                               |
|  |                      |           | rs25489    | Arg280His            | G>A    | 0,03 |                               |
|  |                      |           | rs1799782  | Trp194Arg            | C>T    | 0,09 |                               |
|  |                      |           | rs3213334  | tagging-SNP          | C<T    | 0,25 |                               |
| rs3213245                                | tagging-SNP          | C<T       | 0,22       |                      |        |      |                               |
| PARP1                                    | 23 Exons<br>22-24kb  | 1q41-q42  | rs3219110  | tagging-SNP          | G>A    | 0,42 |                               |
|  |                      |           | rs3754376  | tagging-SNP          | T>G    | 0,37 |                               |
|  |                      |           | rs6668851  | tagging-SNP          | A>C    | 0,25 |                               |
|  |                      |           | rs7542788  | tagging-SNP          | T>C    | 0,22 |                               |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |                      |           |            |                      |        |      |                               |
| LigIV                                    | 2 Exons<br>7,34 kb   | 13q33-q34 | rs1805388  | T9I                  | C>T    | 0,17 |                               |
|  |                      |           | rs1805386  | Asp568Asp            | T>C    | 0,16 |                               |
|  |                      |           | rs1151403  | tagging-SNP          | T>C    | 0,42 |                               |
|  |                      |           | rs9587525  | tagging-SNP          | A>G    | 0,34 |                               |
| MRE11                                    | 20 Exons<br>76,57 kb | 11q21     | rs663530   | tagging-SNP          | C>T    | 0,24 |                               |
|  |                      |           | rs601391   | tagging-SNP          | C>T    | 0,31 |                               |
|  |                      |           | rs552126   | tagging-SNP          | C>A    | 0,28 |                               |
|  |                      |           | rs3017077  | tagging-SNP          | C>T    | 0,34 |                               |
|  |                      |           | rs604845   | tagging-SNP          | G>A    | 0,20 |                               |
|  |                      |           | rs499952   | tagging-SNP          | G>T    | 0,30 |                               |
|  |                      |           | rs13447623 | tagging-SNP          | A>G    | 0,33 |                               |
|  |                      |           | rs1270146  | tagging-SNP          | T>C    | 0,39 |                               |
| rs659349                                 | tagging-SNP          | T>C       | 0,35       |                      |        |      |                               |
| rs1046654                                | 5'UTR                | G>A       | 0,22       | schlag fehl          |        |      |                               |
| NBS1<br>(p95)                            | 16 Exons<br>51,34 kb | 8q21.3    | rs2735383  | Tagging-SNP, 3'UTR   | C<G    | 0,43 | schlag fehl                   |
|  |                      |           | rs709816   | Tagging-SNP          | A>G    | 0,35 | schlag fehl                   |
|  |                      |           | rs741778   | Tagging-SNP          | C>G    | 0,35 |                               |
|  |                      |           | rs2339025  | Tagging-SNP          | A>G    | 0,44 | Callrate <75%                 |
|  |                      |           | rs1805794  | Gln185Glu            | C>G    | 0,45 |                               |
|  |                      |           | rs1063045  | Leu34Leu             | C>T    | 0,28 |                               |
| rs1805796                                | Tagging-SNP          | C>T       | 0,34       |                      |        |      |                               |
| RAD50                                    | 25 Exons<br>86,96 kb | 5q31      | rs2706348  | Tagging-SNP          | G>A    | 0,22 |                               |
|  |                      |           | rs2237060  | Tagging-SNP          | A>C    | 0,38 |                               |

## Kurzdarstellung des Vorhabens

| Name                           | Struktur                            | Lokation | rs – Nr.   | Effekt / Information                    | Allele     | MAF*    | Bemerkung zur Genotypisierung |
|--------------------------------|-------------------------------------|----------|------------|---|------------|---------|-------------------------------|
| XRCC4                          | 8 Exons<br>276,3 kb                 | 5q13-q14 | rs1478486  | tagging-SNP                             | T/C        | 0,42    |                               |
|                                |                                     |          | rs1382367  | tagging-SNP                             | T/C        | 0,43    |                               |
|                                |                                     |          | rs2061783  | tagging-SNP                             | A/G        | 0,50    | schlag fehl                   |
|                                |                                     |          | rs10040363 | tagging-SNP                             | A>G        | 0,48    |                               |
|                                |                                     |          | rs1193693  | tagging-SNP                             | A>G        | 0,48    | Callrate <75%                 |
|                                |                                     |          | rs2075685  | T1394G                                  | G>T        | 0,38    |                               |
|                                |                                     |          | rs2035990  | 3'UTR                                   | T>C        | 0,23    | Callrate <75%                 |
| ATM                            | 63 Exons<br>146,268 kb              | 11q23.1  | rs228589   | tagging-SNP                             | T>A        | 0,22    |                               |
|                                |                                     |          | rs664677   | Intron SNP                              | C>T        | 0,49    |                               |
|                                |                                     |          | rs227060   | tagging-SNP                             | C>T        | 0,22    |                               |
|                                |                                     |          | rs170548   | tagging-SNP                             | T>G        | 0,22    |                               |
|                                |                                     |          | rs1800889  | tagging-SNP                             | C>T        | 0,05    |                               |
|                                |                                     |          | rs611646   | tagging-SNP                             | A>T        | 0,3     |                               |
|                                |                                     |          | rs609429   | Intron SNP                              | G>C        | 0,4     | schlag fehl                   |
|                                |                                     |          | rs1800058  | Intron SNP                              | C>T        | 0,06    | schlag fehl                   |
| <b>Miss Match Repair (MMR)</b> |                                     |          |            |   |            |         |                               |
| MSH2                           | 16 Exons<br>Transcript:<br>80.14 kb | 2p22-p21 | rs10188090 | tagging-SNP                             | G>A        | 0,45    |                               |
|                                |                                     |          | rs1981929  | tagging-SNP                             | A>G        | 0,32    |                               |
|                                |                                     |          | rs3732183  | tagging-SNP                             | G>A        | 0,34    |                               |
|                                |                                     |          | rs3771274  | tagging-SNP                             | G>A        | 0,47    |                               |
|                                |                                     |          | rs4608577  | tagging-SNP                             | T>G        | 0,23    |                               |
|                                |                                     |          | rs4987188  | tagging-SNP                             | G>A        | 0,025   | schlag fehl                   |
|                                |                                     |          | PCNA       | 6 Exons<br>11,670 kb                    | 20pter-p12 | rs25405 | tagging-SNP                   |
| rs3729558                      | tagging-SNP                         | C>G      |            |   |            | 0,47    |                               |
| rs3730424                      | tagging-SNP                         | T>C      |            |   |            | 0,011   |                               |
| rs17351                        | tagging-SNP                         | T>C      |            |   |            | 0,026   | schlag fehl                   |
| rs3626                         | tagging-SNP                         | G>C      |            |   |            | 0,12    | schlag fehl                   |
| rs6107577                      | tagging-SNP                         | T>C      |            |   |            | 0,02    | schlag fehl                   |
| <b>Apoptose</b>                |                                     |          |            |   |            |         |                               |
| TGFB1                          | 6 Exons<br>23,166 kb                | 19q13.2  | rs198207   | L10P                                    | A>G        | 0,25    | schlag fehl                   |
|                                |                                     |          | rs1800469  | -509 C>T zu TGFB1<br>(308bp 3' zu B9D2) | C>T        | 0,31    |                               |
|                                |                                     |          | rs2317130  | tagging-SNP<br>(intron 3 von B9D2)      | T>C        | 0,31    |                               |
|                                |                                     |          | rs8179181  | tagging-SNP                             | C>T        | 0,3     |                               |
|                                |                                     |          | rs4803455  | tagging-SNP                             | C>A        | 0,48    | schlag fehl                   |

MAF Häufigkeit des selteneren Allels (Minor Allele Frequency)

### II.3.2. Definition der Familien und Ermittlung der Kohortengröße der Untersuchung

#### Ermittlung der Kohortengröße

---

##### Fallzahlberechnung Fall-Kontroll-Ansatz

Der Fall / Kontroll-Ansatz sollte als zentrale Untersuchung erachtet werden. Folglich sollte sich die Fallzahl, die durch den Erbgang beeinflusst ist, wesentlich daran orientieren.

Im Folgenden wird die Power eines Armitage-Trend-Test für eine Odds Ratio  $OR \geq 4$  (zwischen homozygot Exponierten und Wildtyp) angegeben. Es wird davon ausgegangen, dass die SNPs das HWE (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) erfüllen und die Diagnose „Lungenkrebs“ auf Grund der histologischen Verifikation mit Sensitivität und Spezifität von 100 % erfolgte.

Hierzu ist es notwendig, die quantitative Zielgröße  $DRC_{30min}$  bezüglich eines Schwellenwertes  $c$  zu dichotomisieren. Der Schwellenwert wird dabei nicht als DRC angegeben, sondern als Anteil (Quantil) jener Beobachtungen, die diesen Schwellenwert  $c$  überschreiten:  $Q_c = p(DRC_{30} > c)$ .

Das globale Signifikanzniveau wird auf  $\alpha = 5\%$  festgelegt. Es darf davon ausgegangen werden, dass alle  $k=27$  tagging-SNPs unabhängig voneinander sind (kein LD), jeder funktionale SNP jedoch im Kopplungsungleichgewicht zu einem tagging-SNP steht. Nach Bonferroni wird daher das lokale Signifikanzniveau mit  $\alpha' = \frac{\alpha}{k} = \frac{5\%}{27} = 0,185\%$  festgelegt.

Die Berechnung der notwendigen Stichprobengröße wird für eine Power von 80% je Einzeltest (SNP) durchgeführt. Angegeben wird die mittlere Stichprobengröße für alle tagging-SNPs.

**Tabelle 2: notwendige Stichprobengröße der (Fall-Kontroll-Studie)**

Mittlere Stichprobengröße insgesamt (Fälle + Kontrollen) eines 2-seitigen Armitage-Trend-Tests auf  $OR=4$ , Fall-Kontroll-Design, lokale Power=80%, lokales Signifikanzniveau  $\alpha=5\%/27=0,185\%$ ,  $Q_c$ ...Quantilsgrenze der DRC zur Klassifikation der Personen als strahlenempfindlich oder unempfindlich

| Matching-verhältnis | Qc  | Erbgang  |         |          |
|---------------------|-----|----------|---------|----------|
|                     |     | dominant | additiv | rezessiv |
| 1:1                 | 5%  | 286      | 266     | 334      |
| 1:1                 | 10% | 276      | 264     | 372      |
| 1:1                 | 15% | 262      | 264     | 416      |
| 1:1                 | 20% | 250      | 264     | 462      |
| 1:2                 | 5%  | 324      | 300     | 369      |
| 1:2                 | 10% | 312      | 297     | 411      |
| 1:2                 | 15% | 297      | 297     | 459      |
| 1:2                 | 20% | 285      | 297     | 513      |

Als robustes Maß, das die meisten aller möglichen Erbgänge in etwa repräsentiert, wird im Folgenden die Fallzahl bei einem additiven Erbgang betrachtet. Damit verbunden ist auch der Vorteil, dass die Wahl des Cut-points  $Q_c$ , für die Einteilung der untersuchten Personen in strahlenempfindlich und –unempfindlich (hinsichtlich des DRC) kaum von Belang ist.

Um eine Power von 80% unter Berücksichtigung der Vielzahl statistischer Test (einer je tagging-SNP, die funktionelle SNPs werden als in LD mit einem tagging-SNP stehend betrachtet) zu erhalten, ist eine Stichprobengröße von  $2 \times 132 = 264$  Personen (Fälle und Kontrollen im Verhältnis 1:1) notwendig.

### Fallzahlberechnung zur Heritabilität

Heritabilität im weiteren Sinn  $h^2$  (broad sense heritability) wird als Anteil der genetischen Varianz  $V_G$  an der gesamten phänotypischen Varianz  $V_P$  definiert. Diese Definition steht in direkter Verbindung zum Konzept der Korrelation des Phänotyps zwischen Verwandten.

Die Heritabilität  $h^2$  des Hauptzielparameters Reparaturkapazität  $DRC_{30min}$  (DNA repair capacity) lässt sich aus der Korrelation  $r$  in drei Familientypen schätzen:

Für die Korrelation des mittleren  $DRC_{30min}$  der Eltern zu dem der Indexperson (mid-parent-offspring setting, PP-I) gilt:  $h^2 = \frac{r}{\sqrt{1/2}} = 1,414 \cdot r$ .

Für die Korrelation des  $DRC_{30min}$  eines Elternteils zu dem des Lungenkrebspatienten (der Indexperson) (one parent-offspring setting, P-I) als auch für die Korrelation zwischen Geschwistern (sib-sib setting, G-I) gilt:  $h^2 = 2r$  (siehe Vogel und Motulsky, S. 206).

Eine Heritabilität  $h^2 = 0,3$  entspricht bei PP-I einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,21$ , für P-I bzw. G-I einem  $r = 0,15$ . Gemäß Fisher's z-Transformation  $z = \frac{1}{2} \ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right)$  gilt bei

einer Stichprobengröße von  $n > 30$  Familien als unverzerrt normal-verteilt)  $z \sim NV\left(\frac{1}{2} \ln\left(\frac{1+\delta}{1-\delta}\right), \frac{1}{n-3}\right)$  ( $\delta$  ... wahre Korrelation). Zur Ausschöpfung aller zur Verfügung

stehenden Information, ist es notwendig die Schätzungen der Korrelationskoeffizienten als Kombination über mehrere Familienkonstellationen, d.h. meta-analytisch, zu behandeln.

Daher betrachten wir als Schätzwert für die Heritabilität  $h^2$  eine lineare Kombination  $z^+$  der jeweiligen Familientypen:  $z^+ = \sum_i (w_i z_i)$ , wobei die Gewichtung  $w_i$  invers proportional zur Varianz  $\text{var}(z_i)$  gewählt wird (Hedges and Olkin, 1985).

Unter Berücksichtigung der Verteilung der Familientypen in der LUCY-Studie (8% PP-I, 75% P-I und 17% G-I) entspricht dieser Ansatz einer einfachen Schätzung eines Korrelationskoeffizienten  $r=0,1622$  (bzw.  $z=0,1615$ ).

Der Fachliteratur sind nur wenige Anhaltspunkte über die Stärke der **Heritabilität** der Strahlenempfindlichkeit zu entnehmen. Werte für  $h^2$  von 30% bis 67% scheinen aber erreichbar.

- Um eine Heritabilität von  $h^2 \geq 30\%$  (entspricht einem  $r \geq 0,16$ ) mit einer Power von 80% als signifikant ausweisen zu können, ist eine Stichprobe von **n = 241 Familien** (entsprechend der Verteilung in der Familientypen in der LUCY-Studie, 501 Personen) notwendig.
- Mit **n = 123 Zweipersonen-Kernfamilien** (entspricht 246 Personen) lässt sich durch Fishers's z-Test (einseitig) auf den 5%-Signifikanzniveau ein  $r \geq 0,223$  mit einer Power von 80% als signifikant ausweisen. Dies entspricht einer Heritabilität von  **$h^2 \geq 44,8\%$** .

## Kurzdarstellung des Vorhabens

---

### Zusammenfassung

Um die erwarteten Assoziationsstärken von  $OR=4$  mit einer 80%-igen Power aufdecken zu können, wurden für den Fall-Kontroll-Ansatz  $2 \times 132$  Personen (Fälle und Kontrollen) benötigt. Für die Schätzung der Heritabilität waren 123 Zweigenerationenfamilien (mit insgesamt 256 Personen) notwendig. Somit war es für das gesamte Projekt notwendig, bei  $(2 \times 132 + 256 =)$  **520 Personen** die Strahlenempfindlichkeit im COMET-Assay zu messen und die Genotypen der ausgewählten Polymorphismen zu bestimmen.

### *Bestandsaufnahme der Familiendaten zum Zeitpunkt des Vertragsbeginns und Festlegung der Nachrekrutierung*

---

Zu Projektbeginn umfasste die LUCY-Study 1590 Studienteilnehmer, darunter 555 LK-Patienten und 1035 Verwandte.

Zu Projektbeginn konnten 307 Familien, bei deren Mitgliedern ausreichend Information (Einverständniserklärung, Fragebogenerhebung und Laborbefunde) und Biomaterial (DNA) vorhanden war, identifiziert werden. Diese Familien bestanden aus mindestens:

- Indexpatient, Vater und Mutter (70 Familien)
- Indexpatient, ein Elternteil, ein Geschwister (84 Familien)
- Indexpatient, ein Geschwister (153 Familien)

Während des Projekts konnten 688 Studienteilnehmer, darunter 240 Patienten, 112 Kinder und 183 Geschwister, neu- bzw. nachrekrutiert und deren Biomaterial zur Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit dem BfS zur Verfügung gestellt werden.

**Tabelle 3: Studienteilnehmer der LUCY-Studie**

|               | LK-Patienten | Eltern | Geschwister | Kinder | Partner | Gesamt |
|---------------|--------------|--------|-------------|--------|---------|--------|
| Projektbeginn | 555          | 240    | 487         | 205    | 103     | 1590   |
| 11.3.2008     | 795          | 350    | 670         | 317    | 146     | 2278   |
| Zuwachs       | + 240        | + 110  | + 183       | + 112  | + 43    | + 688  |

### *Definition der Familien*

---

Die Definition der für die Untersuchung notwendigen Familien wurde in der *Prioritätenliste Familien* vom 11. 1. 2006, sowie deren Ergänzungen von 5. 5. 2006 und 27. 9. 2007 dargelegt.

Die Prioritätenliste von 11.1.2006 enthielt eine Liste von LUCY-Familien mit an dem BfS verfügbaren Blutproben. Diese wurden entsprechend der Priorität gemäß dem Informationsgewinn zur Schätzung der Heritabilität und/oder der genetischen Assoziation zur Strahlenempfindlichkeit gereiht. Personen, bei denen die Isolierung der Lymphozyten nicht erfolgreich war, wurden von der Reihung ausgeschlossen.

Die Priorisierung der Familien nach dem Informationsgehalt für die Schätzung der Heritabilität bzw. für die Schätzung genetischer Assoziation erfolgte zunächst durch eine Einteilung in folgende Familientypen:

**Tabelle 4: Definition der Priorität verschiedener Familientypen**

| Priorität | Familientyp            | Erklärung   |
|-----------|------------------------|---|
| I         | PPI+andere             | <b>vollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind und weiter Familienmitglieder                    |
| II        | PPI (kein anderen)     | <b>vollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind  |
| III       | PI+SK (3 Generationen) | <b>unvollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind mit Geschwister und Kinder des Indexpatienten  |
| IV        | PI+S (2 Generationen)  | <b>unvollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind mit Geschwister des Indexpatienten             |
| V         | IS+andere              | <b>Geschwisterschaften</b> und weiter Familienmitglieder  |
| VI        | IS (kein anderen)      | <b>Geschwisterschaften</b> ohne weitere Familienmitglieder  |
| VII       | PI+K (3 Generationen)  | <b>unvollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind mit Kindern des Indexpatienten                 |
| VIII      | PI (keine S oder K)    | <b>unvollständige Mutter-Vater-Kind-Familien</b> , mit dem Indexpatient als Kind ohne Geschwister und Kinder des Indexpatienten |
| IX        | Sonstige               | alle sonstigen Familien   |
| X         | Einzelperson ist I     | nur Indexpatient  |
| XI        | Einzelperson nicht I   | nur sonstige Personen   |

Familien der Priorität III und IV (unvollständige Mutter-Vater-Kind-Familien mit Geschwistern) mit mehr als 3 Geschwistern wurden zur Priorität I oder II aufgewertet, da erwartet werden darf, dass der Genotyp des fehlenden Elternteils durch die Geschwister rekonstruiert werden kann.

Innerhalb der Familientypen wurden die Familien nach folgenden Kriterien geordnet:

- Anzahl der Generationen
  - ↳ Mutter-Vater-Kind-Familien enthalten
    - ↳ Anzahl der Familienmitglieder
    - ↳ Anzahl der Eltern
      - ↳ Anzahl der Geschwister
        - ↳ Anzahl der Kinder

Den Familien wurde entsprechend der eben beschriebenen Reihenfolge eine Priorität I – IX in der dargelegten Reihenfolge zugewiesen. Familien derselben Priorität wurden als gleichwertig betrachtet.

Zwischen dem 5. 5. 2006 und dem 27. 9. 2007 gingen am BfS Blutproben von weiteren LUCY- Studienteilnehmern ein. Die Prioritätenliste wurde daher im September 2007 aktualisiert. Die Reihenfolge der am BfS durchgeführten COMET-Assays orientierte sich nach der für die Studie bestimmten Priorität der Familien, wie sie in Tabelle 5 dargestellt ist.

## Kurzdarstellung des Vorhabens

**Tabelle 5: Anzahl verfügbarer Familien gemäß Prioritätenliste**

| Familientyp<br>(Priorität)    | Anzahl der Familienmitglieder |     |     |    |    |    |   |   |   |    |    |     | gesamt | in Studie |
|-------------------------------|-------------------------------|-----|-----|----|----|----|---|---|---|----|----|-----|--------|-----------|
|                               | 1                             | 2   | 3   | 4  | 5  | 6  | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |     |        |           |
|                               | Anzahl der Familien           |     |     |    |    |    |   |   |   |    |    |     |        |           |
| I PPI+andere                  |                               |     |     | 14 | 13 | 11 | 2 | 4 |   |    |    | 1   | 45     | 45        |
| II PPI<br>(kein anderen)      |                               |     | 19  |    | 6  | 2  |   |   |   | 1  |    |     | 28     | 26        |
| III PI+SK<br>(3 Generationen) |                               |     |     | 7  | 7  | 2  | 2 |   |   |    |    |     | 18     | 18        |
| IV PI+S<br>(2 Generationen)   |                               |     | 26  | 14 | 1  |    |   |   |   |    |    |     | 41     | 36        |
| V IS+andere                   |                               |     | 10  | 14 | 18 | 6  | 3 | 1 | 3 |    |    |     | 55     | 51        |
| VI IS (kein anderen)          |                               | 44  | 31  | 8  | 7  | 1  | 2 |   |   |    |    |     | 93     |           |
| VII PI+K<br>(3 Generationen)  |                               |     | 3   | 3  | 1  | 1  |   |   |   |    |    |     | 8      |           |
| VIII PI (keine S oder K)      |                               | 30  | 1   | .  | .  | .  | . | . | . | .  | .  | .   | 31     |           |
| IX sonstige                   |                               | 44  | 37  | 18 | 5  | 2  | . | . | . | .  | .  | .   | 106    |           |
| X Einzelperson ist I          | 259                           | .   | .   | .  | .  | .  | . | . | . | .  | .  | .   | 259    | 1         |
| XI Einzelperson nicht I       | 28                            | .   | .   | .  | .  | .  | . | . | . | .  | .  | .   | 28     |           |
| gesamt                        | 287                           | 118 | 127 | 78 | 58 | 25 | 9 | 5 | 3 | 1  | 1  | 712 | 177    |           |

COMET-Assays wurden im Laufe des Projekts an Biomaterial von Familien der Priorität I bis V und einer Einzelperson (Priorität X) durchgeführt. Nach Ausschluss von nicht verwertbaren Experimente konnten 177 Familien, darunter 71 mit beiden Eltern (Priorität I und II) für die in der Familienstudie ausgewertet werden.

### II.3.3. Lymphozytenpräparation und Immortalisierung

Die separierten mononuklearen Leukozyten (Ficoll Dichtegradientenzentrifugation) wurden qualitätskontrolliert (Trypanblau Vitalitätstest), quantifiziert (Türksche Lösung) und in 1 ml Aliquots pro Kryoröhrchen ( $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml) in RPMI Glutamax Medium mit 20% FCS, 5% Antibiotika (Penicillin / Streptomycin) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) mit einer Rate von  $1^\circ\text{C}$  pro min bis  $-130^\circ\text{C}$  (Consarctic freezer system, Schöllkrippen, Germany) eingefroren und zur Lagerung in Stickstoffgasphase transferiert.

Für die Herstellung von LCL Kulturen wurden die separierten mononuklearen Leukozyten im B95-8 Überstand (EBV-Suspension), verdünnt mit frischem RPMI Glutamax Medium mit 20% FCS und 5% Antibiotika und  $1\mu\text{g CSA/ml}^2$ , auf  $2 \times 10^6$  Zellen /ml eingestellt. Kultivierung der lymphoiden Starter-Zelllinie erfolgte nach Neitzel et al 1986. Die erste Subkultivierung mit RPMI Glutamax Medium mit 20% FCS und 5% Antibiotika erfolgte nach 3-4 Wochen. Die fertigen Zelllinien wurden in einer Konzentration von  $5-10 \times 10^6/\text{ml}$  1 ml Aliquots pro Kryoröhrchen ( $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml) in RPMI Glutamax Medium mit 20% FCS, 5% Antibiotika (Penicillin / Streptomycin) und 10% DMSO mit einer Rate von  $1^\circ\text{C}$  pro min bis  $-130^\circ\text{C}$  (Consarctic freezer system, Schöllkrippen, Germany) gekühlt und in Stickstoffgasphase zu Langzeitlagerung transferiert.

### II.3.4. Genetische Analyse der Polymorphismen

Die Genotypisierung erfolgte mit dem MassARRAY System (Sequenom, San Diego, USA). Zunächst wurde die DNA durch PCR mittels HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden)

amplifiziert. Die Genotypisierungs-Assays wurden mit 5 ng genomischer DNA durchgeführt. Die Endkonzentration der PCR Primer betrug 167nM für ein PCR Volumen von 6 µl.

**Tabelle 6: PCR-Bedingungen**

| Schritt       | Temperatur | Dauer     | Zyklen |
|---------------|------------|-----------|--------|
|               | 94°        | 15 min    | 1x     |
| Denaturierung | 94°        | 20 sec    | ] 45x  |
| Annealing     | 56°        | 30 sec    |        |
| Elongation    | 72°        | 60 sec    |        |
|               | 72°        | 3 min     | 1x     |
|               | 20°        | permanent | 1x     |

Die PCR Produkte wurden anschließend mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP; Amersham, Freiburg) für 20 min bei 37°C inkubiert, um überschüssige dNTPs zu entfernen. Eine weitere Inkubation erfolgte bei 85°C für 10 Minuten, um die SAP zu deaktivieren.

Für die Basenextensionsreaktion wurde eine Thermo Sequenase (Amersham) benutzt. Die Endkonzentration der Extensionsprimer betrug 5.4 mM in einem 10 µl Reaktionsvolumen.

**Tabelle 7 Basenextensionsreaktion-Bedingungen**

| Schritt       | Temperatur | Dauer     | Zyklen     |
|---------------|------------|-----------|------------|
|               | 94°        | 30 sec    | 1x         |
| Denaturierung | 94°        | 5 sec     | ] 5x ] 45x |
| Annealing     | 52°        | 5 sec     |            |
| Elongation    | 80°        | 5 sec     |            |
|               | 72°        | 3 min     | 1x         |
|               | 20°        | permanent | 1x         |

Alle Reaktionen (PCR Amplification, Basenextension) wurden in einem Tetrad PCR thermal cycler (MJ Research) durchgeführt. Die finalen Basenextensionsprodukte wurden mit SpectroCLEAN Resin (Sequenom) behandelt, um restliche Salze aus dem Reaktionpuffer zu entfernen. Dieser Schritt wurde mit Hilfe eines Pipettierroboters (Multimek 96 channel auto-pipette (Beckman Coulter)) durchgeführt und 16 µl einer Resin/Wasser-Suspension wurden in jede Basenextensionsreaktion auf ein Gesamtvolumen von 26 µl aufgefüllt. Nach schneller Zentrifugation (2000 rpm, 3 min) in einer Eppendorf Zentrifuge 5810 wurden 10 nl der Reaktionslösung auf einen 384-format SpectroCHIP (Sequenom) gespottet (SpectroPoint nano-dispenser (Sequenom)), auf dem sich eine Matrix aus 3-Hydroxypicolinsäure befand.

Ein modifizierter Bruker „matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass Spektrometer“ (Sequenom) wurde für die Datenaquisition von dem SpectroCHIP benutzt. Die Genotypisierungs-Calls wurden in Echtzeit mit der SpectroTYPER RT 4.0 software (Sequenom) ausgewertet. Die Genotypisierung wurde durch Geschlechts-SNPs und Doppelt-Genotypisierungen qualitätsgeprüft. Die Genotypen wurden in entsprechende Datenbanken abgelegt.

### II.3.5. Strahlensensitivitätsanalyse mit dem COMET-Assay

Im alkalinen COMET-Assay werden der DNA einer Zelle experimentell, zum Beispiel durch Bestrahlung, Strangbrüche beigelegt. In Agarose fixierte Zellen so zerstückelter genomischer DNA werden anschließend auf Objektträger aufgebracht und einer alkalischen Mikrogel-Elektrophorese unterworfen. Bei dieser „Dehnung“ der DNA entsteht ein Wanderungsmuster,

## Kurzdarstellung des Vorhabens

---

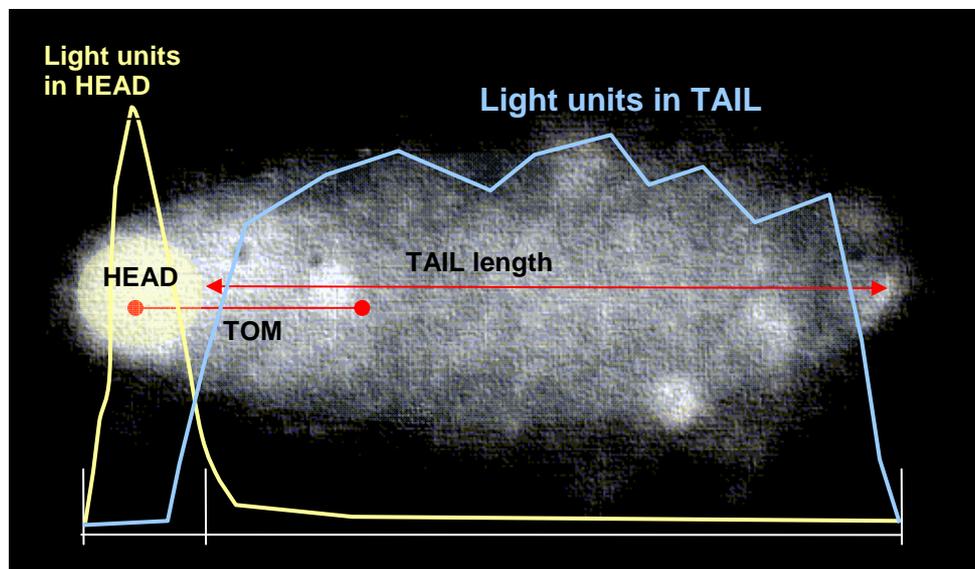
das dem Bild eines „Kometen“ gleicht. Dieses wird fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht und mit automatischen Messsystemen (für das Projekt verwendet: COMETImager der Fa. Metasystems, Altlußheim) vermessen. Kritisch ist die Wahl einer der vielen möglichen Maßzahlen als die Strahlungsschädigung der DNA repräsentierende Zielgröße (siehe dazu Abschnitt 0). Indem man den Zellen im Anschluss an die Bestrahlung erlaubte, in einem bestimmten Zeitraum (10, 30 und 60 min) die induzierten Schäden zu reparieren, kann die zelluläre DNA-Reparaturkapazität (DRC), die Reduktion der DNA Schädigung über die Zeit, ermittelt werden. Für eine detailliertere Beschreibung des alkalinen COMET-Assays siehe auch Gomolka et al., 2005.

### *Wahl der DNA-Schädigungsmaße aus dem COMET-Assay*

---

Im COMET-Assay werden experimentell der DNA einer Zelle Strangbrüche beigefügt. Die so zerstückelte DNA wird anschließend durch Elektrophorese gedehnt, so dass das Bild eines Kometen entsteht. Diese Bild wird schließlich vermessen, wobei die automatischen Messsysteme bis zu 35 verschiedene Maßzahlen ermitteln können (Kumaravel 2006). Als sinnvolle Maße der DNA-Schädigung werden der „tail olive moment“ (TOM) und der Anteil „light units“ im Kometenschwanz (%DNA) empfohlen (Collins 2008, Lovell und Omiri 2008, Kumaravel 2006). TOM ist eine Größe, die aus der Länge des Kometenschwanzes (tail length: TL) gemessen vom Schwerpunkt des Kometenkopfes zum Schwerpunkt des Kometenschweifs und %DNA abgeleitet wird. Beide Maße erwiesen sich in vorangegangenen Untersuchungen sowohl zur Strahlendosis, als auch zur Reparaturzeit ausreichend korreliert.

**Abbildung 1: Maße der DNA-Schädigung am Bilde einer Zelle im COMET-Assay**



%DNA und TOM unterscheiden sich jedoch inhaltlich in der Quantifizierung eines induzierten Strahlungsschadens. TL reflektiert, wie weit die DNA-Stücke gedehnt werden können. Da kleinere DNA-Stücke in der Elektrophorese aus dem Zellkern wandern, kann TL als Maß für die Größe der DNA-Stücke angesehen werden. %DNA hingegen misst den Anteil an DNA, der während der Elektrophorese aus der Zelle wandert. Es ist somit mehr ein Maß der Häufigkeit von DNA-Brüchen (Kumaravel 2006). Für %DNA konnte mehrfach eine lineare Korrelation zur Strahlendosis beobachtet werden (Collins 2006). TOM als abgeleitete Größe quantifiziert beide Messmöglichkeiten eines Strahlungsschadens. Collins 2006 merkt hierzu an:

„The advantage of doing so (beide Messmöglichkeiten vereinen) is not so clear, as it may make the dose-response curve deviate from linearity at low doses“.

Für die statistische Auswertung wurde zunächst der winsorisierte Mittelwert je Einzel-experiment als primäre Zielgröße bestimmt. Das winsorisierte Mittel ist der Mittelwert einer Stichprobe (hier der Werte für TOM oder %DNA je Zelle), bei der die 5% größten Werte durch das 95%-Quantil und die 5% kleinsten Wert durch das 5%-Quantil ersetzt werden. Das winsorisierte Mittel ist damit robuster gegen einzelne Ausreißer als der arithmetische Mittelwert.

%DNA und TOM unterscheiden sich auch hinsichtlich der Eigenschaften als Zufallsvariable. %DNA ist eine Größe zwischen 0 und 1, unabhängig von dem benutzten Messsystem. Ein Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen und unterschiedlichen Zellmaterials ist möglich. Für TOM als abgeleitete Größe von TL kann die Maßeinheit zwischen unterschiedlichen Messsystemen variieren. Ebenso ist bekannt, dass TL zwischen Biomaterial und Spezies stark variieren kann. Da für viele statistische Verfahren normal-verteilte Zielgrößen vorausgesetzt werden, ist eine Transformation von TOM und %DNA notwendig. Die statische Modellanpassung erfolgt daher für den Logarithmus von TOM ( $\ln TOM$ ) und dem logit von %DNA. Hierzu sei angemerkt, dass die logit-Transformation für %DNA gleich 0 oder 1 nicht möglich ist und bei Werten nahe diesen Limits klare Abweichungen von der Normalverteilung erkennen lässt.

$$X_k^{(\ln TOM)} = \ln(\bar{X}_{i,k}^{(\ln TOM)}) \quad \text{beziehungsweise} \quad X_k^{(\logit \% DNA)} = \ln\left(\frac{\bar{X}_{i,k}^{(\% DNA)}}{1 - \bar{X}_{i,k}^{(\% DNA)}}\right)$$

mit k als Index der experimentellen Konfiguration (k=0 Gy, 4 Gy / 0 min, 4 Gy / 10 min, 4 Gy / 30 min, 4 Gy / 60 min) und i als Index einer einzelnen Zelle (i=1,...,200)

Aus diesen primäre Zielgröße wurden schließlich die drei, in der statischen Auswertung verwendeten sekundären Zielgrößen (der Basisschaden, der strahlungsinduzierte Initialschaden und die DNA-Reparaturkapazität) abgeleitet.

Der Basisschaden B entspricht dabei der primären Zielgröße bei einer experimentellen Konfiguration ohne Bestrahlung (also 0 Gy):

$$B_{\ln TOM} = X_{0 Gy}^{(\ln TOM)} \quad \text{beziehungsweise} \quad B_{\logit \% DNA} = X_{0 Gy}^{(\logit \% DNA)}$$

Der strahlungsinduzierte Initialschaden I entspricht dabei der primären Zielgröße bei einer experimentellen Konfiguration direkt nach Bestrahlung (also 4 Gy / 0 min.), abzüglich des Basisschadens:

$$I_{\ln TOM} = X_{4 Gy / 0 min}^{(\ln TOM)} - X_{0 Gy}^{(\ln TOM)} \quad \text{beziehungsweise} \quad I_{\% DNA} = X_{4 Gy / 0 min}^{(\logit \% DNA)} - X_{0 Gy}^{(\logit \% DNA)}$$

Die DNA-Reparaturkapazität DRC wird für die Zeitpunkte 10 min, 30 min und 60 min nach Bestrahlung bestimmt. Sie ist jener Anteil des strahleninduzierten Initialschadens I, der zu diesen Zeitpunkten bereits repariert wurde. Dazu wird zunächst der verbleibende Schaden S analog zu I um den Basisschaden bereinigt:

$$S_t^{(\ln TOM)} = X_{4 Gy / t min}^{(\ln TOM)} - X_{0 Gy}^{(\ln TOM)} \quad \text{beziehungsweise} \quad S_t^{(\logit \% DNA)} = X_{4 Gy / t min}^{(\logit \% DNA)} - X_{0 Gy}^{(\logit \% DNA)}$$

mit t=10 min, 30min oder 60 min.

Dann wird der Anteil des verbleibenden Schaden  $S$  am strahlungsinduzierten Initialschaden  $I$  bestimmt und von 1 abgezogen:

$$DRC_t^{(\ln TOM)} = 1 - \frac{S_{\ln TOM, t}}{I_{\ln TOM}} \quad \text{beziehungsweise} \quad DRC_t^{(\log it\% DNA)} = 1 - \frac{S_{\% \log DNA, t}}{I_{\log it\% DNA}}$$

### **II.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Lungenkrebs ist eine schwere Erkrankung, die durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden kann. Belege dafür liefern Studien zur Exposition von Radon in Wohnräumen (Darby et al. 2005; Wichmann et al. 2005), zum Risiko von Uranbergarbeitern (BEIR VI Report) und Untersuchungen von Überlebenden der Atombombenabwürfe auf Japan 1945, (Wakeford 2004; Boffetta et al. 2002).

Personen mit bestimmten Gendefekten für ein erhöhtes Krebsrisiko scheinen sensibler gegenüber ionisierender Strahlung und Schäden auf zellulärem Level zu sein (IARC 2000). Genomische Instabilität während der Karzinogenese ist in einer bemerkenswerten Vielzahl von Krebserkrankungen zu finden (Tischfield and Shao 2003). Es existieren Hinweise, dass Personen mit Lungenkrebs im jungen Alter ein instabileres Genom haben als die durchschnittliche Bevölkerung (Kreuzer et al. 1999) und die Erkrankungsrate an Lungenkrebs bei den Personen, die einer geringen Strahlendosis ausgesetzt waren, zum Beispiel durch das Edelgas Radon, erhöht ist (Kreuzer et al. 1999).

Ein Zusammenhang zwischen individueller Strahlensensitivität und erhöhter Suszeptibilität für Krebs, abhängig vom Genotyp des Individuums, erscheint möglich. Die genauen Mechanismen strahleninduzierter Suszeptibilität sind aber weitgehend unbekannt. Ebenso ist unbekannt, wie genomische Instabilität die individuelle Sensitivität gegenüber Strahlung zum Beispiel während der Strahlentherapie, oder umgekehrt, wie individuelle Strahlenempfindlichkeit genomische Instabilität beeinflusst.

#### **II.4.1. Genomische Instabilität, Strahlensensitivität, Lungenkrebs, Genmutationen und niedrig penetrante Genpolymorphismen**

Das Risiko für einen akuten oder späteren Schaden eines Organismus als Folge von Strahlenexposition ist in der Bevölkerung sehr heterogen. Mögliche Gründe für eine erhöhte individuelle Strahlenempfindlichkeit sind schwere Genmutationen, die zwar sehr selten, aber phänotypisch gut charakterisiert sind. Vererbliche Defekte in der DNA Reparaturkapazität, die assoziiert sind mit Gendefekten, zum Beispiel in ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und NBS (Neuro Blastoma Suppressor), führen zu einer extremen Sensitivität gegenüber akuter, strahleninduzierter Gewebeschädigung in betroffenen Personen. Es wird diskutiert, dass die Ursache für ein erhöhtes Risiko für strahlenabhängige Spätschäden (vor allem für die Tumorentwicklung) in Keimbahndefekten von Tumorsuppressor-Genen liegt.

Zusätzlich zu den schweren Genmutationen gibt es zahlreiche Hinweise, dass niedrig penetrante Genpolymorphismen die individuelle Krebsdisposition beeinflussen (z.B. Hung et al. 2008; Thorgeisson et al. 2008; Amos et al. 2008; Rosenberger et al. 2007; Sauter et al. 2008). Die im Zusammenhang mit Strahlenempfindlichkeit und niedrig penetranten Polymorphismen am häufigsten diskutierten Gene sind DNA Reparatur-, Apoptose- und Zellzykluskontroll-Gene (Scott et al. 2004). Vorangegangene Analysen identifizierten diese Gene als Modifier

von Lungenkrebsrisiko und Strahlenempfindlichkeit (Angele et al. 2003; Chang-Claude et al. 2005; Popanda et al. 2004; Hung et al. 2006).

### **II.4.2. Strahlenempfindlichkeit, Lungenkrebs und Heritabilität**

Einige wenige Studien untersuchten die Vererbbarkeit der individuellen Strahlenempfindlichkeit. Einen ersten Hinweis auf eine höhere Heritabilität erbrachte eine Untersuchung chromosomaler Strahlenempfindlichkeit in Brustkrebsfamilien (Roberts et al. 1999). Hier waren in Brustkrebsfamilien mit strahlensensitiven Patientinnen 62% der 1. Grad Verwandten ebenfalls strahlensensitiv, während bei nicht sensitiven Patientinnen lediglich 6,2% der 1. Grad Verwandten Strahlensensitivität zeigten. Ein weiterer starker Hinweis auf eine hohe Heritabilität von Strahlensensitivität kommt aus einer Zwillingsstudie, die zeigen konnte, dass die Heritabilität der Sensitivität gegenüber  $\gamma$ -Strahlung 62,5% beträgt (Wu et al. 2006)

### **II.4.3. Biologie der DNA-Reparatur, Kandidaten-Gene und Kandidaten-SNPs**

Lebende Zellen sind ständig chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt. Alle molekularen Bestandteile der Zelle werden dadurch häufig in ihrer Struktur geschädigt. Wenn Proteine oder Lipide ihre Funktion wegen struktureller Schädigung nicht mehr erfüllen können, werden sie abgebaut und neu synthetisiert. Die DNA hat als Träger der Erbinformation eine konservatorische Funktion. Wenn ihre molekulare Struktur geschädigt ist, wird sie daher durch aufwändige Reparaturprozesse wieder instand gesetzt.

Die DNA-Struktur kann sowohl endogen als auch exogen beschädigt werden. Dabei ist gleichermaßen die nukleäre DNA wie die DNA von Mitochondrien betroffen. Wichtige endogene oder exogene Verursacher von DNA-Schäden sind nichtenzymatische Hydrolyse, reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), alkylierende oder quervernetzende Agenzien sowie ionisierende Strahlung. Die entstandenen Schäden lassen sich in 3 Gruppen einteilen: räumlich kleine DNA-Modifizierungen, die sich nicht auf die Struktur der Doppelhelix auswirken, räumlich große DNA-Modifizierungen, welche die dreidimensionale Struktur der Doppelhelix stören, und DNA-Strangbrüche. Die Auswirkungen dieser Schäden reichen von der Blockierung von Transkription oder Replikation über Mutagenese bis hin zum Zelltod. Zu ihrer Behebung existiert eine Vielzahl komplexer Mechanismen mit teilweise redundanter Funktion. Für die Reparatur von kleinen DNA-Modifizierungen und Einzelstrangbrüchen ist vor allem der BER-Mechanismus zuständig (Seeberg et al., 1995). Großräumige DNA-Modifizierungen werden vor allem durch „nucleotide excision repair“ (NER) repariert (Hanawalt, 2002). Doppelstrangbrüche werden abhängig vom Zellzyklus durch „non-homologous end joining“ (NHEJ, G1-Phase) oder „homologous recombination“ (HR, S/G2-Phase) repariert (Hoeijmakers, 2001). Der DNA-Reparaturmechanismus „mismatch repair“ (MMR) korrigiert die Folgen von DNA-Schädigung durch Replikationsfehler (Young et al., 2003). Die Existenz einer Vielzahl von Gendefekten, bei denen die DNA-Reparatur gestört ist, unterstreicht die Bedeutung dieser Mechanismen (Christmann et al., 2003).

## Kurzdarstellung des Vorhabens

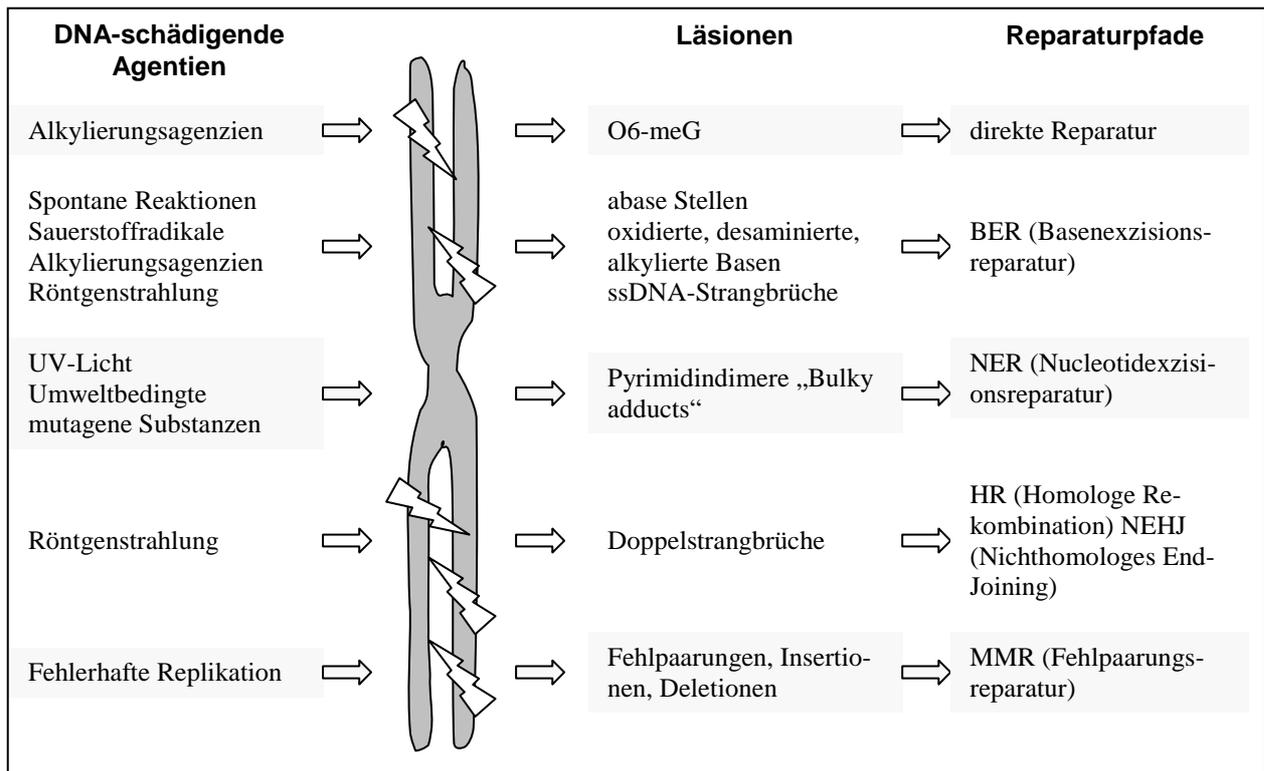


Abbildung 1. Häufigste DNA-schädigende Agentien, Läsionen und Reparaturpfade.

### II.4.4. Base Excision Repair (BER) Reparatur

Einzelbasenschädigungen sind meist endogenen Ursprungs und werden hauptsächlich von reaktiven Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) verursacht, die im aeroben Stoffwechsel entstehen. Die exogene Schädigung von Zellen durch ionisierende Strahlung (Röntgen- und Gammastrahlung) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führt ebenfalls zur Oxidation von DNA-Basen.

Diese oxidativen DNA-Schäden und Strangbrüche können im alkalischen COMET-Assay nachgewiesen werden. Diese Schäden wirken *in vivo* durch Fehlpaarung direkt mutagen oder blockieren die DNA-Replikation. Der wichtigste Reparaturweg für oxidative Schäden ist der „Base Excision Repair“-Reparaturweg (BER), der durch schadensspezifische Glycosylasen, wie die (humane) 8-Oxo-Guanin-DNA-Glycosylase (hOGG1), eingeleitet, die geschädigte Base entfernt. Das entstandene „Single Nucleotide gap“ wird durch Polymerase  $\beta$  gefüllt und über den DNA Ligase III / XRCC1 (X - Ray Cross Complementing Group 1) -Komplex verbunden (short patch base excision repair) (Überblick in Hung et al. 2005). Außer den genannten Reparaturenzymen ist auch das Enzym PARP-1 am BER-Mechanismus beteiligt. PARP-1 synthetisiert aus NAD<sup>+</sup> verzweigte PAR-Ketten und modifiziert damit Proteine. Die genaue Funktion von PAR bei der DNA-Reparatur ist jedoch noch unzureichend geklärt.

#### 8-Oxo Guanin Glycosylase 1 (hOGG1)

Ein Schlüsselenzym der Basen Excision Reparatur (BER) ist (h)OGG1 ((human)-8-Oxo Guanine Glycosylase 1). hOGG1 umfasst genomisch 8,13 kb mit 7 Exons auf Chromosom 3 p26.2. hOGG1 codiert für sieben alternative mRNAs, wobei die zwei Haupttranskripte für ein 36 bzw. 40 kDa großes mitochondriales Polypeptid codieren (Überblick in Gros et al., 2002),

das als DNA-Glycosylase agiert und assoziierte AP-Lyase-Aktivität hat. hOGG1 wird in der Literatur mit Strahlensensitivität (Hyun et al. 2002; De Ruyck et al., 2005) in Zusammenhang gebracht, wobei dem Enzym eine wichtige Rolle für das Überleben der Zellen nach strahlen-induzierter Schädigung zugesprochen wird (Hyun et al. 2002). Die *in vitro* DNA-Reparaturkapazität scheint durch Mutation von hOGG1 beeinflusst zu sein (Aka et al. 2004).

Auch in Zusammenhang mit Lungenkrebs wird hOGG1 diskutiert (Überblick in Hung et al. 2005). Die Rolle des Ser326Cys Polymorphismus bei Lungenkrebs wurde mehrfach untersucht und widersprüchlich diskutiert. Park et al. 2004 konnte zum einen eine Dosis-abhängige Assoziation bei Rauchern und zum anderen eine signifikante Assoziation mit dem Befund eines Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinoms zeigen. Wikman et al. 2000 und Le Marchand et al. 2002 fanden dagegen keine Assoziation dieses Polymorphismus mit Lungenkrebs in Kaukasiern.

### XRCC1 (X-Ray Cross complementing group 1)

---

XRCC1 (X-Ray Cross Complementing Group 1) umfasst genomisch 32,25 kb mit 17 Exons auf Chromosom 19 q13.2 und codiert für ein Protein mit 633 Aminosäuren. XRCC1 wird als Scaffold (Träger-) Protein für eine effiziente DNA-Reparatur benötigt. XRCC1 defiziente Zellen sind nicht lebensfähig.

Die am häufigsten untersuchten SNPs sind Arg195Trp in Exon 6 (rs1799782), Arg280His in Exon 9 (rs25489) und Arg399Gln in Exon 10 (rs25487). Es gibt widersprüchliche Angaben über Assoziationen des Arg399Gln Allels mit höheren Aflatoxin B1-DNA-Addukten und höherer Bleomycinsensitivität (Überblick in Hung et al 2005).

### PARP1

---

PARP1 umfasst 23 Exons auf Chromosom 1q41-q42 und ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören die DNA Reparaturmechanismen für Einzelbasenschädigungen und Einzelstrangbrüche sowie die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen und Apoptose (Schultz et al., 2003). Dabei ist PARP1 über die Modifizierung von Histonen an der Regulation der Chromatinstruktur beteiligt (Kraus und Lis, 2003) und reguliert die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Lis, 2003; Ziegler und Oei, 2001). Eine Überexpression von PARP-1 durch starke Schädigung der DNA kann zum Zelltod führen. Es wird vermutet, dass die exzessive PAR-Synthese die zellulären NAD<sup>+</sup>-Vorräte verbraucht. Das führt zum Zusammenbruch der Atmungskette und zum Verbrauch der ATP-Vorräte, woraus schließlich Zelltod resultiert (Bürkle, 2001). Außerdem ist das Enzym an Entzündungsreaktionen beteiligt, was sowohl auf die Induktion von Zelltod, als auch auf die Regulation von an Entzündungsprozessen beteiligten Transkriptionsfaktoren zurückgeführt wird (Chiarugi, 2002).

#### **II.4.5. Non Homologous End Joining (NHEJ)**

Beim NHEJ handelt es sich gegenüber der Homologen Rekombination (HR) um den überwiegenden Pathway zur Doppelstrangbruchreparatur in höheren Eukaryoten, vor allem in der sich nicht replizierenden Zelle (Lieber et al. 2004, Collis et al. 2005). Dieser Reparaturmechanismus ist in Prokaryoten, niederen Eukaryoten und Säugern konserviert. Der grundlegende Unterschied zwischen HR und NHEJ ist die Abhängigkeit der HR von DNA-Homologien.

## Kurzdarstellung des Vorhabens

---

NHEJ erkennt keine oder nur kleine Homologien und kann so in der G1 und in der frühen S-Phase genutzt werden.

Der genaue Mechanismus des NHEJ wird unterschiedlich dargestellt. Wesentlich ist aber der MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex) als eine Art Schnittstelle für „Single Strand Annealing“ (SSA), Non Homologous End Joining (NHEJ) und Homologe Rekombination (HR). Er lagert sich an die offenen Enden der DNA nach Doppelstrangbruch an und schützt diese vor Exonucleaseverdau. Weiterhin signalisiert dieser Komplex das Vorhandensein dieses schwerwiegenden DNA-Schadens und trägt damit zur Entscheidung bei, welcher Reparaturweg eingeschlagen wird. In humanen Gliomkulturen ist dies zu 90% das NHEJ (Valerie et al. 2003). Weitere Schlüsselenzyme, die beim NHEJ eine wichtige Rolle spielen, sind das Heterodimer Ku70 / Ku86, Artemis und der XRCC4-Ligase4-Komplex, der die offenen DNA-Enden ligiert.

Es gibt bisher lediglich interessante Hinweise, aber noch wenig Erkenntnisse über die Zusammenhänge von SNPs innerhalb dieses Pathways und Strahlenempfindlichkeit, so dass sich mit der Untersuchung dieser Gene und SNPs neue Erkenntnisse gewinnen lassen.

### *NBS1 (Nibrin, Nijmegen Breakage Syndrom1)*

---

NBS1 (p95, Nibrin, Nijmegen Breakage Syndrom1) umfasst genomisch 51,34 kb mit 16 Exons auf Chromosom 8q21.3 und codiert für ein Protein mit 754 Aminosäuren.

NBS1 bildet zusammen mit MRE11 (Meiotic Recombination 11 homolog A (*S. cerevisiae*)) und RAD50 (Homolog of *S. cerevisiae*) den MRN-Komplex.

Ein Defekt in NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrom) prädisponiert für Strahlenempfindlichkeit und Krebs (Collis et al., 2005). Mehrfach in Bezug auf Krebs, vor allem Brustkrebs, wurde der Polymorphismus untersucht, der zum Aminosäureaustausch an Position 185 (Glu185Gln) führt. So war zum Beispiel das Vorkommen der p53 Mutation, die mit Lungenkrebs assoziiert ist, bei Trägern des NBS1-185Gln Allels (Medina et al., 2003) erhöht. Auch Lan et al. 2005 fanden eine positive Assoziation des NBS1-185Gln Alleles mit Lungenkrebs in einer chinesischen Population. Die Komplexbildung von NBS1 mit MRE11 und RAD50 und die zentrale Stellung dieses Komplexes in der DNA-Reparatur von sowohl Einzelstrangbrüchen, als auch Doppelstrangbrüchen bringt konsequenterweise die Untersuchung des gesamten Komplexes in Hinblick auf Polymorphismen mit sich.

### *MRE11 (Meiotic Recombination 11 Homolog A (*S. cerevisiae*))*

---

Bei MRE11, einem weiteren Bestandteil des MRN-Komplexes, handelt es sich um ein Gen mit genomischen 76,57 kb auf Chromosom 11q21. Das Protein (708 Aminosäuren) allein hat 3'-5' Exonuklease- und Endonuklease-Aktivität (Paull et al. 2000, Trujillo et al. 1998).

Der Phänotyp einer Mutation dieses Gens ruft eine Ataxia-Telangiectasia ähnliche Krankheit hervor (Delia et al. 2004). Diese Krankheit prädisponiert unter anderem auch für Strahlenempfindlichkeit und Krebs. Ein Fehlen von MRE11 führt zu Mikrosatelliteninstabilität und falschem DNA „Mismatch Repair“ (MMR) (Vo et al. 2005).

### *Lig4 (Ligase 4)*

---

Eine weitere Schnittstelle im NHEJ (Non Homologous End Joining) ist der Proteinkomplex aus Ligase 4 (Lig4) und X-Ray Cross Complementing Group 4 (XRCC4), welcher die Ligation der durch den MRN-geschützten und prozessierten DNA-Enden bewerkstelligt. Lig4 hat eine genomische Größe von 7,34 kb und ist auf Chromosom 13q33 mit zwei Exons lokalisiert.

Die DNA-Ligase4 macht den entscheidenden DNA-Verknüpfungsschritt bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch NHEJ. LIG4 defiziente Zellen sind stark strahlenempfindlich. Patienten mit Lig4-Mutationen haben klinisch einen ähnlichen Phänotyp wie Patienten mit NBS-Syndrom (O' Driscoll et al 2001)

Sakiyama et al. 2005 zeigte für Japaner eine signifikante Assoziation mit Lungenkrebs für einen nichtsynonymen Polymorphismus (Ile658Val, rs2232641), dessen MAF in der europäischen Population zu gering ist, als dass er in den vorliegenden Stichproben sinnvoll untersucht werden könnte. Ein anderer nichtsynonymer SNP, der zum Austausch von Threonin durch Isoleucin an Aminosäureposition 9 (T9I) führt, hat eine MAF von 16% und macht so eine Untersuchung in vorliegender Stichprobe möglich. Dieser SNP wurde mit A3V von Roddam et al. 2002 beschrieben und zeigt offensichtlich eine Assoziation mit dem Auftreten eines Myeloms. Girard et al. 2004 fand eine zweifach reduzierte Aktivität der Ligase 4 im Falle der Mutation an dieser Stelle, und Fu et al, 2003, fand keine Assoziation zu Brustkrebs bei Taiwanesen. Trotz keiner eindeutigen Aussagen in Bezug auf Strahlenempfindlichkeit, Lungenkrebs und Krebs handelt es sich hier um einen häufig erwähnten nichtsynonymen SNP mit einer ausreichend hohen Häufigkeit in europäischen Populationen.

### *XRCC4 (X-Ray-Cross-Complementing-Group-4)*

---

XRCC4 umfasst genomisch 276,3 kb. Die 8 Exons sind auf Chromosom 5q13-14 lokalisiert. Das eigentliche Genprodukt ist nur noch 1,7 kbp lang. XRCC4 ist für die Stabilisierung, Aktivität und Stimulierung der Adenylierung (initialer Schritt der Ligation) des Ligase 4-Enzyms essentiell. Gao et al. (1998) inaktivierten das XRCC4-Gen in Mäusen und zeigten für diese Zellkulturen Wachstumsdefekte, verfrühte Seneszenz, Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und die Unfähigkeit V(D)J-Rekombination aufrechtzuerhalten. Fu et al. 2003 zeigte eine signifikante Assoziation des nichtsynonymen Polymorphismus rs2075685 (= T1394G) mit dem Risiko für Brustkrebs.

### *ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)*

---

Das ATM-Gen umfasst 150 kb auf Chromosom 11q22-q23 und kodiert mit 66 Exons für eine Proteinkinase, die in vielen Geweben exprimiert wird. ATM ist ein Tumorsuppressor-Gen und findet sich in mutierter Form in Ataxia Telangiectasia, einer seltenen autosomal rezessiven Erkrankung, die durch extrem hohe Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung oder anderen DSB induzierenden Agenzien charakterisiert ist (Taylor et al. 2005). Das ATM-Protein spielt über die Phosphorylierung von Proteinen in mehreren DNA-Reparaturwegen eine Schlüsselrolle (Shiloh et al. 2003). ATM kommt in einer inaktiven multimeren Form im Zellkern vor, die nach einem Doppelstrangbruch in Monomere dissoziiert (Bakkenist et al. 2003). Das NBS1-Protein bildet zusammen mit den Proteinen MRE11 und RAD50 den be-

reits erwähnten MRN-Komplex, der in das durch DSB aktivierte Signaltransduktionsnetzwerk der ATM-Kinase integriert ist. Die Interaktion zwischen dem MRN (MRE11, RAD50, NBS1) Komplex und ATM bei Vorhandensein geschädigter DNA führt zu einer 80fach erhöhten ATM-Kinase-Aktivität wobei der MRN-Komplex zur vollen Aktivierung der ATM-Kinase benötigt wird. Die ATM-Kinase phosphoryliert auch viele andere Proteine wie z.B. den BRCA1/ RAD51-Komplex, der in direkter Weise an der DSB Reparatur über den Mechanismus der homologen Rekombination beteiligt ist. Yang et al. 2007 genotypisierten 11 ATM Polymorphismen in 556 kaukasischen NSCLC Patienten und 556 Kontrollen und fanden zwei Varianten (rs227060 und rs170548) assoziiert mit einem erhöhten Risiko für NSCLC (OR=1.55 (1.02-2.35)). Im COMET-Assay zeigten Yang et al. 2007, dass die homozygoten Träger des selteneren Allels eine signifikant erhöhte DNA Schädigung nach  $\gamma$ -Bestrahlung hatten.

### *RAD50 (RAD50 Homolog of S. cerevisiae)*

---

Bei der dritten MRN-Komplex-Komponente, RAD50, handelt es sich um ein hoch konserviertes Gen. RAD50 umfasst 86,96 kb mit 25 Exons und ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert. Das Protein beinhaltet 1311 Aminosäuren.

Die zwei ausgewählten HapMap tagging-SNPs decken 11 SNPs ( $r^2 \geq 0,8$ , Tabelle 1) mit einer MAF über 20% ab. Die Ergebnisse einer der jüngsten Untersuchung von Mutationen im MRN-Komplex lassen vermuten, dass diese mit einem Risiko für erblichen Brustkrebs und / oder Eierstockkrebs einhergehen und auch bei anderen Krebsarten eine wichtige Rolle spielen (Heikkinen et al. 2005).

#### **II.4.6. Fehlpaarungsreparatur (MismatchRepair) und Apoptose**

Die DNA-Replikation ist ein hochkomplexer und präziser Prozess. Dennoch fügen replikative Polymerasen ungefähr 1 fehlerhaftes Nucleotid pro 105 Nucleotide ein, und die mit der Polymerase assoziierte 3'-5'-Proofreading-Aktivität reduziert diese Fehlerrate indem fehlgepaarte Nucleotide entfernt werden, bevor der DNA-Strang durch die Polymerase verlängert wird. Die verbleibenden Fehler werden durch Fehlpaarungsreparatur (MMR, „Mismatch Repair“) bekämpft, die Basen-Basen-Fehlpaarungen und von Polymerasen eingefügte Nucleotid-Deletionen und -Insertionen eliminiert. Im Wesentlichen ist das MMR-System von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert.

MMR ist einzigartig unter den DNA-Reparaturpfaden, denn MMR-Enzyme müssen eine der zwei chemisch unveränderten, aber fehlgepaarten Basen als Urheber der entstandenen Fehlpaarung erkennen. Die unterschiedliche Art der Strangdiskriminierung ist einer der zentralen Unterschiede der MMR-Systeme in Prokaryoten und Eukaryoten. Bei Eukaryoten ist die Ursache der Strangunterscheidung durch das MMR-System bislang nicht bekannt. Gängigen Modellen zufolge ist die MMR-Maschinerie eng mit dem Replikationsapparat gekoppelt, was vermutlich zur Identifizierung des neu synthetisierten Stranges mithilfe eines Replikationsgedächtnisses genutzt wird. Ein Verlust der MMR bewirkt eine fehlende Erkennung der DNA-Addukte, so dass die Apoptose nicht eingeleitet werden kann.

### *MSH2 und PCNA*

---

Das MSH2 Gen ist eine Komponente des hoch konservierten postreplikativen DNA Fehlpaarungsreparatur Systems (MMR, „Mismatch Repair“). Die Enzyme dieses Systemes beeinflussen die Genauigkeit der MMR Reparatur, indem sie Loops und Primerfehlpaarungen in repetitiven DNA-Sequenzen entfernen und auch Einzelbasen-Fehlpaarungen, die das Polymerase Proofreading-System nicht erkennt, korrigieren. Dadurch wird eine Anhäufung spontaner Mutationen verhindert und die Integrität und Stabilität des Genomes gesichert.

Die Beteiligung von MSH2 an der Pathogenese von Krebs wird in der Fachliteratur wiederholt beschrieben. So sind MSH2 und MLH1 die am häufigsten beteiligten Gene bei erblichem, nicht polypösen, kolorektalem Krebs (Quinn et al. 1995; Charames et al. 2003; Muller and Fishel 2002), aber auch bei sporadischen Tumoren des Kolons (Lothe et al. 1993), des Endometriums (Caduff et al. 1996), des Magens (Renault et al. 1996), des Kopfes und Halses (Field et al. 1995), und der Prostata (Watanabe et al. 1996) sind MSH Mutationen beschrieben.

Es wird vermutet, dass eine erhöhte MSH2 Expression in diesen Erkrankungen mit einer erhöhten Zellteilung einhergeht (Marra et al. 1996), die zudem mit einer Expression des Proliferationsmarkers PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positiv korreliert ist (Hamid et al. 2002). Barwell et al. 2007 konnten zeigen, dass normale primäre Zellen, die in ihrer MSH2-Funktion eingeschränkt waren, eine erhöhte Sensitivität zu ionisierender Strahlung entwickelten.

### *TGFB1*

---

*Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )*, lokalisiert auf Chromosom 19q13.1, gehört zu einer Familie multifunktionaler Zytokinen und reguliert sowohl physiologische als auch pathologische zelluläre Prozesse, wie Differenzierung und auch Apoptose (Massague et al. 1998, Whitman et al. 1998). Die verschiedenen Isoformen von TGF $\beta$  agieren sowohl als Tumorsuppressor als auch als Oncogen. Eine Beeinträchtigung von TGF $\beta$  kann zu verschiedenen fibrotischen als auch malignen Erkrankungen führen. Während in gesundem Gewebe die Tumorsuppressor – Aktivität von TGF $\beta$  überwiegt, scheint im Tumorgewebe die oncogene Aktivität eine überwiegende Rolle zu spielen (de Caestecker et al. 2000). Es ist bekannt, dass Strahlung zur Induktion der TGF $\beta$ 1-Isoform führt (O'Malley et al. 1999; Wang et al. 1996). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass TGF $\beta$  ein Hauptmediator für zelluläre und gewebespezifische Antworten für ionisierende Strahlung sein kann. Die Hemmung von TGF $\beta$  in Epithelzellen modifiziert die Strahlenempfindlichkeit und initiiert die Aktivierung des Antwortprogrammes auf DNA-Schädigung (Reparatur / Apoptose). Der erste Transducer auf die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung, die durch ionisierende Strahlung hervorgerufen wird, ist die nukleare Proteinkinase ATM, deren Aktivität beeinträchtigt ist, wenn TGF $\beta$  gehemmt ist. Die Rolle von TGF $\beta$ 1 im genotoxischen Stressprogramm könnte daher weiter reichen als bisher angenommen und zum Beispiel ein wichtiger Faktor für die individuelle Modulation von Strahlentherapie sein. Verschiedene Studien zeigten signifikante Assoziationen zwischen TGF $\beta$ 1 rs1982073 (L10P) und rs1800469 (-509 C>T zu TGF $\beta$ 1, 308bp 3' zu B9D2) und dem Risiko von strahleninduzierten Spätschäden in Brustkrebspatientinnen (Andreassen et al. 2003, Quarmby et al. 2003, Andreassen et al. 2005), wobei TGF $\beta$  1 rs192073 (L10P) einen starken Einfluss auf die Sekretion von TGFB1 zu haben scheint (Dunning et al. 2003). Vorangegangene Ergebnisse zeigen, dass eine Untersuchung der genetischen Modifikationen

von TGF $\beta$ 1 und deren Auswirkungen auf die *in vitro* Strahlenempfindlichkeit auch von therapeutischer Bedeutung sein kann.

### **II.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Das Projekt forderte eine enge Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Strahlenschutz, das die Lymphozytenpräparationen und die *in vitro* Strahlenempfindlichkeitsuntersuchungen an diesen mittels COMET-Assay durchführte. Das Institut für Biometrie und Epidemiologie der LMU war verantwortlich für die Genotypisierungen, die Erstellung der LCL-Biobank, die Erstellung einer gemeinsamen Datenbank und die Koordination des Projektes. Die Abteilung Genetische Epidemiologie der UMG betreute das Projekt statistisch, sowohl in der Projektplanung, dem Projektverlauf und der Auswertung aller Laboranalysen und stand damit ständig in engem Kontakt sowohl mit dem BfS als auch mit dem LMU-Institut. Die Neu- und Nachrekrutierung von LK-Patienten und der Familienmitgliedern erfolgte gemeinschaftlich durch LMU, BfS und UMG.

### III. Eingehende Darstellung der einzelnen Projekte

#### III.1 Bioprobenbank LCL

Vertraglich vereinbart war das Anlegen von Zelllinien von Lymphozyten (LCL) von mindestens 120 Familien, davon 100 2- Generationenfamilien - und 20 3- Generationenfamilien, mit insgesamt 500 Familienangehörigen.

Im Ganzen wurden von 758 Personen Zelllinien von Lymphozyten (LCL) angelegt. Diese gehören zu 32 3-Generationenfamilien (mit bis zu 12 Familienmitgliedern), 125 2-Generationenfamilien (mit bis zu 9 Familienmitgliedern) und 60 1-Generationenfamilien (wobei bei 35 von keinem weiteren Familienmitglied eine LCL angelegt werden konnte).

**Tabelle 8: Übersicht LCL (Lymphozyten Zelllinien)**

| Anzahl Generationen | All |      | Anzahl Personen |     |       |
|---------------------|-----|------|-----------------|-----|-------|
|                     | N   | %    | Min             | Max | Summe |
| 1                   | 60  | 28%  | 1               | 5   | 102   |
| 2                   | 125 | 58%  | 2               | 9   | 475   |
| 3                   | 32  | 15%  | 3               | 12  | 181   |
| <i>gesamt</i>       | 217 | 100% | 1               | 12  | 758   |

| Anzahl Generationen | All |      | Anzahl Personen |     |    |     |    |     |    |     |            |     |
|---------------------|-----|------|-----------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|------------|-----|
|                     |     |      | 1               |     | 2  |     | 3  |     | 4  |     | 5 und mehr |     |
|                     | N   | %    | N               | %*  | N  | %*  | N  | %*  | N  | %*  | N          | %*  |
| 1                   | 60  | 28%  | 35              | 58% | 15 | 25% | 6  | 10% | 1  | 2%  | 3          | 5%  |
| 2                   | 125 | 58%  |                 |     | 16 | 13% | 44 | 35% | 33 | 26% | 32         | 26% |
| 3                   | 32  | 15%  |                 |     |    |     | 1  | 3%  | 9  | 28% | 22         | 69% |
| <i>gesamt</i>       | 217 | 100% | 35              | 16% | 31 | 14% | 51 | 24% | 43 | 20% | 57         | 26% |

- je Tabellenzeile

### **III.2 Messung der Strahlungsschädigung und DNA-Reparaturkapazität im COMET-Assay**

#### **III.2.1. Auswertbarkeit und Verwertbarkeit der Einzelexperimente**

##### *Begriffsbestimmungen*

---

###### **Auswertbarkeit**

Ein Einzelexperiment gilt als auswertbar, wenn mindestens 50 Zellen vermessen wurden und entweder TOM, %DNA oder TL bestimmt werden konnten. Ferner wurden Einzelexperimente dann als nicht auswertbar klassifiziert, wenn aufgrund von Anomalitäten bei der Durchführung des Assays oder grob unplausibler Messwerte bei allen drei Zielgrößen (TOM, %DNA und TL) die Validität angezweifelt wurde.

###### **Verwertbarkeit**

Auswertbare Experimente können ferner für die Studienzwecke durch **Designmängel** (Abweichungen vom Assay-Protokoll: Bestrahlungsdosis, Reparaturdauer, verwendetes Material, ...) für die Studienzwecke nicht verwertbar werden.

Die Ursachen für den Wegfall der Verwertbarkeit können Fehler in der Durchführung des Experiments oder fehlende Auswertbarkeit der Einzelexperimente sein.

Nicht jeder Designmangel führt jedoch zu einem Wegfall der Verwertbarkeit für alle Fragestellungen. So können Personen ohne verlässliche Messung des Basisschadens bei Untersuchungen des strahlungsinduzierter Initialschadens verwertet werden und umgekehrt. Auch können einzelne Messungen bei dem Versuch betreffenden Designmängel prinzipiell zur Adjustierung aller Messungen verwertet werden. Einzelexperimente wurden von der Datenanalyse bei falscher Strahlendosis oder Reparaturzeit, oder auch wenn LCL anstelle von Blut oder nicht verwertbares Material verarbeitet wurde, ausgeschlossen.

Eine Übersicht, wann welcher Designmangel zum Verlust der Verwertbarkeit führt: siehe Tabelle 9.

##### *Zusammenfassung*

---

Insgesamt wurden 12427 Einzelexperimente in 173 Versuchen an Biomaterial von 1204 Studienteilnehmern und einer humanen Referenz durchgeführt. Die Messungen der humanen Referenz wurden in allen 173 Versuchen vorgenommen, die Messungen von 283 Studienteilnehmern wurden wiederholt (264-mal doppelte, 17-mal dreifache, 2-mal vierfache Messung). Somit wurden Messungen an 1664 „Personen“ (im Sinne von beobachtbaren Einheiten) vorgenommen.

Bei 369 Einzelexperimenten wurden keine validen und reliablen Messungen erzielt (Assay-Daten sind daher nicht verfügbar, siehe Tabelle 11). Von den verbleibenden Einzelexperimenten waren 901 (7,2%) nicht auswertbar (siehe Tabelle 11), weitere 114 Einzelexperimente (0,9%) wurden aufgrund von Designmängeln ausgeschlossen.

## Messung der Strahlenschädigung (COMET-Assay)

Für die Datenauswertung standen schließlich 11.043 Einzelexperimente aus 170 Versuchen und Blut von 1.160 Personen (1151 Studienteilnehmer und einer Humanen Referenz) zur Verfügung.

Für die **Fall-Kontroll-Studie** standen **4994 Einzelexperimente** aus 82 Versuchen und Blut von 348 Personen (**177 Fälle, 170 Kontrollen** und einer Humanen Referenz) zur Verfügung.

Für die **Familienstudie** standen **5698 Einzelexperimente** aus 82 Versuchen und Blut von 799 Personen (**187 Indexpatienten, 611 Verwandte** und einer Humanen Referenz) zur Verfügung (siehe Tabelle 10).

Die restlichen 351 Einzelexperimente verfielen auf die 6 Probeversuche.

**Tabelle 9 Übersicht: Auswertbarkeit und Designmängel vs. Fragestellungen**

|  |  | gesamt | Adjustieren der Messwerte | Bestimmen auffälliger Personen | Fall-Kontroll-Studie |    |    | Familienstudie |    |    |
|--|--|--------|---------------------------|--------------------------------|----------------------|----|----|----------------|----|----|
|  |  |        |                           |                                | B                    | V  | R  | B              | V  | R  |
| <b>nicht auswertbar</b>                            |  | x      | x                         | x                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
| <b>auswertbar ohne Designmangel</b>                |  | ✓      | ✓                         | ✓                              | ✓                    | ✓  | ✓  | ✓              | ✓  | ✓  |
| <b>auswertbar mit Designmangel</b>                 |  |        |                           |                                |                      |    |    |                |    |    |
| <b>Einzel-experiment</b><br>(je Slide)             | • falsche Strahlungsdosis oder Reparaturzeit         | x      | x                         | x                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
|  | • LCL anstelle von Blut                              | x      | x                         | x                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
| <b>Experiment</b><br>(je Person)                   | • Basisschaden nicht messbar                         | x✓     | ✓                         | ✓                              | x                    | ✓  | x  | x              | ✓  | x  |
|  | • strahlungsinduzierter Initialschaden nicht messbar | x✓     | ✓                         | ✓                              | ✓                    | x  | x  | ✓              | x  | x  |
|  | • Reparatur nicht messbar                            | x✓     | ✓                         | ✓                              | ✓                    | ✓  | ✓  | x              | ✓  | x  |
|  | • nichtverwertbares Material verwendet*              | x      | x                         | x                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
|  | • Person mit ME (nur Familienstudie)                 | x✓     | ✓                         | ✓                              | --                   | -- | -- | x              | x  | x  |
| <b>Versuch</b><br>(je Familie oder je FuK-Versuch) | • Probeversuch                                       | x✓     | ✓                         | ✓                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
|  | • kein LC-Fall im Versuch                            | x✓     | ✓                         | ✓                              | x                    | x  | x  | x              | x  | x  |
|  | • Familien ohne Verwandte                            | x✓     | ✓                         | ✓                              | x                    | x  | x  | --             | -- | -- |
|  | • FuK - Versuch ohne Kontrolle                       | x✓     | ✓                         | ✓                              | --                   | -- | -- | x              | x  | x  |

B.....Basisschaden, V...strahlungsinduzierter Initialschaden, R... Reparaturfähigkeit

\*.....keine EV vorhanden, Positivkontrolle

✓ ....trifft zu, x...trifft nicht zu

## Messung der Strahlenschädigung (COMET-Assay)

Tabelle 10 Übersicht: Zusammensetzung der Studienpopulation

|                             | Einzel-<br>experimente | Versuche   | Personen*   | Studien-<br>teilnehmer | HR       | Studienteilnehmer als<br>Person |            |           |          | unbekannte<br>ID** |
|-----------------------------|------------------------|------------|-------------|------------------------|----------|---------------------------------|------------|-----------|----------|--------------------|
|                             |                        |            |             |                        |          | 1<br>mal                        | 2<br>mal   | 3<br>mal  | 4<br>mal |                    |
| <b>ausgeschlossen</b>       | 1384                   | 132        | 435         | 334                    | 1        | 313                             | 17         | --        | --       | 3                  |
| <b>eingeschlossen</b>       | 11043                  | 170        | 1577        | 1159                   | 1        | 919                             | 228        | 9         | 2        | --                 |
| Fall-Kontroll-Studie        | 4994                   | 82         | 434         | 347                    | 1        | 340                             | 6          | --        | --       | --                 |
| Familienstudie              | 5698                   | 82         | 1123        | 798                    | 1        | 565                             | 222        | 9         | 2        | --                 |
| Probeversuch                | 351                    | 6          | 20          | 14                     | 1        | 14                              | --         | --        | --       | --                 |
| <b>Gesamt</b>               | <b>12427</b>           | <b>173</b> | <b>1663</b> | <b>1204</b>            | <b>1</b> | <b>917</b>                      | <b>264</b> | <b>17</b> | <b>2</b> | <b>3</b>           |
| <b>Fall-Kontroll-Studie</b> |                        |            |             |                        |          |                                 |            |           |          |                    |
| Fälle                       | 2169                   | 75         | 183         | 177                    | --       | 171                             | 6          | --        | --       | --                 |
| KORA-Kontrollen             | 1923                   | 66         | 169         | 170                    | --       | 169                             | --         | --        | --       | --                 |
| HR                          | 902                    | 82         | 84          | 1                      | 1        | --                              | --         | --        | --       | --                 |
| <b>Familienstudie</b>       |                        |            |             |                        |          |                                 |            |           |          |                    |
| Indexpatient                | 1275                   | 81         | 254         | 187                    | --       | 126                             | 54         | 5         | 2        | --                 |
| Verwandter                  | 3798                   | 77         | 787         | 611                    | --       | 439                             | 168        | 4         | --       | --                 |
| HR                          | 625                    | 82         | 82          | 1                      | 1        | --                              | --         | --        | --       | --                 |

\* Person im Sinne von beobachtbarer Einheiten. Für einige Studienteilnehmer wurden in mehreren Versuchen Experimente durchgeführt.

\*\* beinhaltet die beiden Positivkontrollen des Versuchs 207 und eine Kontrolle (Versuch 211)

HR...Humane Referenz

**Tabelle 11     Auswertbarkeit der Einzelexperimente**

| <i>Einzelexperiment zur Auswertung geeignet</i> | <i>Verwertbarkeit für Studie:</i> |                         | <i>Alle</i>            |              |
|---|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------|
|   | <i>nicht auswertbar</i>           | <i>auswertbar</i>       |                        |              |
| <i>auffälliger Verlauf</i>                      | 18                                |                         | 0,1%                   |              |
| <i>ganzer Versuch unbrauchbar</i>               | * 79                              |                         | 0,6%                   |              |
| <i>unglaublicher Messwert</i>                   | 1                                 |                         | 0,0%                   |              |
| <i>zu wenig Zellen</i>                          | 744                               |                         | 6,0%                   |              |
| <i>auswertbar</i>                               | ** 59                             | 10931                   | 88,4%                  |              |
| <i>auswertbar nach Korrektur</i>                |                                   | 83                      | 0,7%                   |              |
| <i>auswertbar, aber auffälliger Verlauf</i>     |                                   | 29                      | 0,2%                   |              |
| <i>gesamt: Assay-Daten verfügbar</i>            | <b>901</b><br>(7,5%)              | <b>11043</b><br>(92,5%) | <b>11944</b><br>(100%) | <b>96,1%</b> |
| <i>keine Assay- Daten verfügbar</i>             | 369                               |                         | 369                    | 3,0%         |
| <i>gesamt</i>                                   | <b>1270</b><br>(10,3%)            | <b>11043</b><br>(89,7%) | <b>12313</b><br>(100%) | <b>99,1%</b> |
| <i>Auszuschließen aufgrund von Designmängel</i> | *** 114                           |                         | 114                    | 0,9%         |
| <i>gesamt</i>                                   | <b>1384</b><br>(11,1%)            | <b>11043</b><br>(88,9%) | <b>12427</b><br>(100%) | 100%         |

\* beinhaltet Versuch 53 (Agarose nicht verwertbar oder teilweise abgelöst) sowie die Positivkontrolle von Versuch 207

\*\* Bei 59 auswertbaren Einzelexperimenten wurden Designmängel festgestellt, die die Messwerte des Einzelexperiments für die Studienziele unbrauchbar machen: bei 52 Einzelexperimenten wurde LCL anstelle von Blut verwendet, bei 2 Einzelexperimenten wurde mit einer falschen Dosis bestrahlt, bei 5 Einzelexperimenten wird eine vertauschte Blutprobe vermutet.

\*\*\* 109 Einzelexperimente wurden mit Blutproben von Personen gemacht, deren Einverständniserklärung nicht auffindbar war.

## III.2.2. Qualitätskontrolle und Validierung der Messungen

Der COMET-Assay ist ein Experiment mit mannigfaltigen, schwer kontrollierbaren, in ihrer Auswirkung unbekanntem Störeinflüssen, z. B. exakte experimentelle Strahlungsdosis, Umweltstrahlung, exakte Reparaturzeit. Daher sollten soweit möglich vor der statistischen Auswertung der aus den Projektzielen abgeleiteten Fragestellungen die Validität der Messungen untersucht werden. Als endogene, den Ablauf der Einzelexperimente charakterisierende, Faktoren wurden daher betrachtet:

- Trend der Messungen innerhalb eines Einzelexperimentes
- Wartezeit: Zeit seit dem Messbeginn aller zu einem Versuch gehörenden Einzelexperimente
- Vermessungsdauer eines Einzelexperiments
- Anzahl vermessener Zellen
- Position der Proben im Objektträgerwechsler
- Zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes

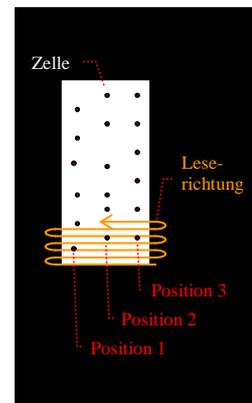
Veränderungen, beziehungsweise Unterschiede in den Messwerten des lnTOM und des logit %DNA wurden auf statistische Signifikanz geprüft.

### Trend der Messungen innerhalb eines Einzelexperimentes

Abbildung 2: Verlauf der Zellvermessung (schematische Darstellung)

Mittels einfachen linearen Regressionsmodellen wurde für jedes Einzelexperiment (Objektträger, Slide) ein Trend der Messwerte hinsichtlich der Position der Zelle auf dem Objektträger untersucht. Als Surrogat für die nicht genau bekannte Position wurde dabei die laufende Nummerierung der Zellen herangezogen (siehe schematische Darstellung rechts).

Bei 89,9% der Objektträger konnte kein Trend auf dem 5%-Signifikanzniveau hinsichtlich lnTOM, bei 93,1% hinsichtlich logit %DNA beobachtet werden (siehe Tabelle 12). Damit liegt der Anteil Einzelexperimente mit systematischem Trend in den Messwerten 2x (lnTOM) bzw. 1,4x (logit %DNA) höher als durch den Zufall bedingt erwartet (5%). Einen höchst signifikanten Trend ( $p < 0.001$ ) zeigten 1,5% der Einzelexperimente hinsichtlich lnTOM und 0,4% hinsichtlich logit %DNA. Damit liegt der Anteil Einzelexperimente mit einem stark ausgeprägten, systematischen Trend in den Messwerten 15x (lnTOM) bzw. 4x (logit %DNA) höher als durch den Zufall bedingt erwartet werden darf (0,1%).



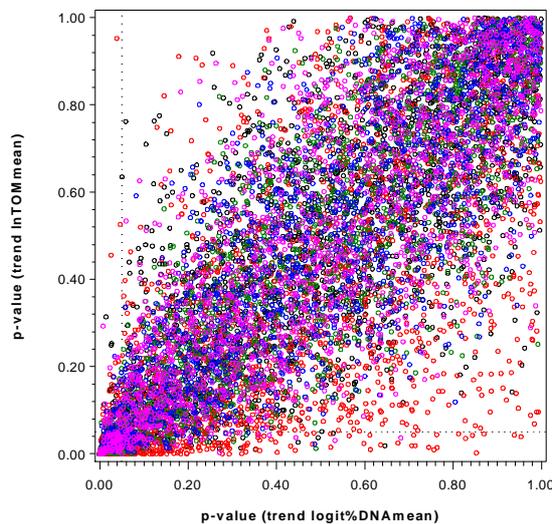
**Tabelle 12: Trend innerhalb eines Barcodes: p-Werte**

| experimentelle Konfiguration | sig*** (p<=0.001) |     | sig** (p<=0.01) |     | sig* (p<=0.05) |      | not. sig. |      |
|------------------------------|-------------------|-----|-----------------|-----|----------------|------|-----------|------|
|                              | N                 | %   | N               | %   | N              | %    | N         | %    |
| <b>InTOM</b>                 |                   |     |                 |     |                |      |           |      |
| 0 Gy                         | 10                | 0.4 | 29              | 1.1 | 153            | 5.7  | 2502      | 92.9 |
| 4 Gy / 0 min                 | 109               | 5.2 | 123             | 5.8 | 213            | 10.1 | 1661      | 78.9 |
| 4 Gy / 10 min                | 13                | 0.8 | 37              | 2.2 | 87             | 5.2  | 1549      | 91.9 |
| 4 Gy / 30 min                | 10                | 0.6 | 17              | 1.0 | 88             | 5.3  | 1557      | 93.1 |
| 4 Gy / 60 min                | 7                 | 0.4 | 29              | 1.7 | 94             | 5.7  | 1531      | 92.2 |
| Alle                         | 149               | 1.5 | 235             | 2.4 | 635            | 6.5  | 8800      | 89.6 |
| <b>logit %DNA</b>            |                   |     |                 |     |                |      |           |      |
| 0 Gy                         | 3                 | 0.1 | 26              | 1.0 | 112            | 4.2  | 2553      | 94.8 |
| 4 Gy / 0 min                 | 20                | 0.9 | 56              | 2.7 | 159            | 7.5  | 1871      | 88.8 |
| 4 Gy / 10 min                | 8                 | 0.5 | 20              | 1.2 | 72             | 4.3  | 1586      | 94.1 |
| 4 Gy / 30 min                | 3                 | 0.2 | 15              | 0.9 | 70             | 4.2  | 1584      | 94.7 |
| 4 Gy / 60 min                | 5                 | 0.3 | 24              | 1.4 | 84             | 5.1  | 1548      | 93.2 |
| Alle                         | 39                | 0.4 | 141             | 1.4 | 497            | 5.1  | 9142      | 93.1 |

Die Korrelation der p-Werte für einen Trend von InTOM und logit %DNA korrelieren mit  $\rho=0,8$  stark miteinander, unabhängig von der experimentellen Konfiguration (siehe Abbildung 3). Einzelexperimente, die aus irgendeinem Grund zu systematisch sich ändernden Messwerten neigen, zeigen diesen Trend hinsichtlich InTOM wie hinsichtlich logit %DNA. Damit darf ein solcher Trend als in Ablauf des Experiments oder des Vermessungsprozesses begründet angenommen werden.

Bei allen Experimenten mit einem beobachtbaren Trend auf dem 1%-Signifikanzniveau wurden die Messwerte vor der Weiterverarbeitung für diesen Trend adjustiert.

**Abbildung 3: Trend innerhalb eines Barcodes: Korrelation der p-Werte für InTOM und logit %DNA**



○...Basisschaden, ○...Initialschaden, ○...Reparatur nach 10 Minuten,  
 ○...Reparatur nach 30 Minuten, ○...Reparatur nach 60 Minuten

### Wartezeit

---

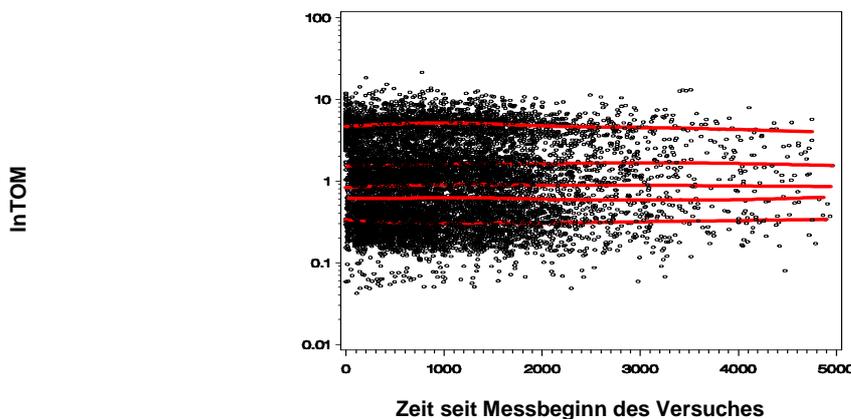
Die Vermessung eines Versuches kann eine Zeitspanne von bis zu 2 Tagen in Anspruch nehmen. Als zweiter endogener Faktor wurde daher die Zeit seit dem Messbeginn des Versuches (kurz Wartezeit) untersucht. Das automatische Messsystem registriert die Zeit bei Beginn der Vermessung eines Einzelexperiments. Für Versuche, die an zwei Messsystemen parallel vermessen wurden, wurden die entsprechenden Messverläufe als Basis der Betrachtungen herangezogen. Zur statistischen Auswertung wurde die Wartezeit in 4 Kategorien eingeteilt: 0-800 Minuten, 801-1150 Minuten, 1151-1800 Minuten und mehr als 1800 Minuten.

Rund die Hälfte aller Einzelexperimente (47%) wurden innerhalb der ersten 800 Minuten (~13 Stunden) vermessen. 17% der Einzelexperimente mussten jedoch über 1800 Minuten (30 Stunden) auf die Vermessung warten.

Den deutlichsten Trend zeigte %logit DNA bezüglich des Initialschadens (4 Gy / 0 min). Im Mittel waren bei den spät vermessenen Einzelexperimenten (Wartezeit >1800 Minuten) 19,7% DNA im Kometenschwanz, bei den früh vermessenen jedoch 22,5%, also rund das 1,14-fache. Ein ähnlicher Trend konnte hinsichtlich InTOM beobachtet werden (siehe Abbildung 4). Auch der Basisschaden zeigt eine signifikante Abhängigkeit von der Wartezeit für beide Messgrößen.

Dennoch ist die Wartezeit für weniger als 1% der Variabilität der Messungen verantwortlich, und somit vernachlässigbar.

**Abbildung 4: Wartezeit bis zur Vermessung: InTOM**



Die Kurven entsprechen den Mittleren Verlauf je experimenteller Koffiguration von oben nach untern: Initialschaden, nach 10-, 30-, 60-Minuten Reparatur und Basisschaden

### Vermessungsdauer

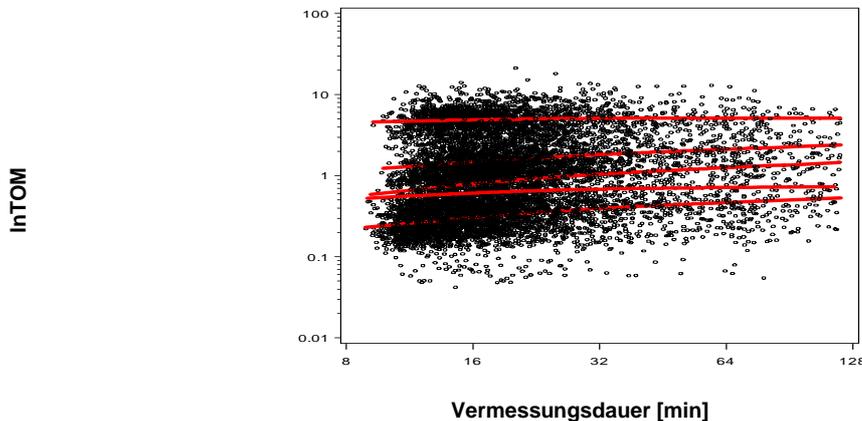
---

Die Vermessung von Einzelexperimente dauerte in der Regel etwa 18 Minuten (Median), bei 3% der Einzelmessungen jedoch länger als 2 Stunden. Als dritter endogener Faktor wurde daher die Vermessungsdauer untersucht. Diese wurde aus den vom Messsystem automatisch registrierten Zeiten zu Beginn der Vermessung eines Einzelexperiments berechnet, enthält somit auch die Dauer des Wechsels von einem Einzelexperiment zum nächsten. In der statischen Auswertung wurde der Logarithmus der Vermessungsdauer berücksichtigt, um längere Vermessungsdauern stärker zu gewichten. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Vermessungsdauer in 4 Kategorien eingeteilt: 1-<12,5 Minuten, 12,5-<15 Minuten, 15-<21 Minuten und länger als 21 Minuten.

Die Vermessung von je 1/3-tel der Einzelerperimente benötige zwischen 12,5-<15 Minuten (32%) bzw. 15-<21 Minuten (33%). Mit Ausnahme beim Initialschaden und beim Schaden nach 60 Minuten Reparatur hinsichtlich InTOM, konnte bei allen experimentellen Konfigurationen ein signifikanter Einfluss der Vermessungsdauer auf den InTOM, als auch auf den logit %DNA beobachtet werden. Der deutlichste Trend lässt sich für den Basisschaden hinsichtlich InTOM beobachten. Dauerte die Vermessung weniger als 12 Minuten, so lag der TOM im Mittel bei 0,23 (95%-CI: 0,22-0,24). Dauerte die Vermessung hingegen 21-120 Minuten, so lag der TOM im Mittel bei 0,41 (95%-CI: 0,38-0,43), war also um rund das 1,78-fache höher. Für den Initialschaden konnte eine entsprechenden 1,12-fache, für 10-, 30- und 60-Minuten Reparatur eine 1,69-, 2,20- und 1,51-fache Erhöhung beobachtet werden. Bezüglich dem %DNA im Schweif waren die Erhöhungen das 1,44-, 1,02-, 1,35-, 1,64- und das 1,27-fache.

Es zeigt sich somit überstimmend in allen experimentellen Konfigurationen eine (meist signifikante) Tendenz zu höheren Messwerten mit längerer Vermessungsdauer. Dieser Einflussfaktor ist für 4,8% (InTOM) bzw. 2,1% (logit %DNA) der Variabilität der Messungen verantwortlich, und bedarf daher weiterer Berücksichtigung.

**Abbildung 5: Vermessungsdauer eines Einzelerperiments: InTOM**



Die Kurven entsprechen den Mittleren Verlauf je experimenteller Konfiguration von oben nach unten: Initialschaden, nach 10-, 30-, 60-Minuten Reparatur und Basisschaden

### Anzahl vermessener Zellen

Gemäß Versuchsprotokoll wurden 200 Zellen je Einzelerperiment zum Vermessen ausgewählt. Davon wurden etwa „hedgehogs“, „ghost cells“ und andere entartete Zellen, die etwa auf Apoptose schließen lassen, ausgeschlossen. Experimente mit weniger als 50 Zellen blieben bei der weiteren statischen Auswertung unberücksichtigt. In nur ~9% der Einzelerperimente standen schließlich mehr als 190 verwertbare Zellen zur Berechnung der Zielgrößen zur Verfügung. Beim Initialschaden war dieser Anteil mit 4,6 % am niedrigsten, nach einer Reparatur von 30, bzw. 60 Minuten mit 11,4% und 10,6% am höchsten. Im Mittel wurden 173 Zellen je Einzelerperiment vermessen.

Als vierter endogener Faktor wurde daher die Anzahl vermessener Zellen untersucht. In die statische Auswertung wurde der Logarithmus der Anzahl nicht berücksichtigter Zellen (= 200 – Anzahl vermessener Zellen) betrachtet. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Anzahl vermessener Zellen in 4 Kategorien eingeteilt: 50-170 Zellen, 171-180 Zellen, 181-190 Zellen und 191-200 Zellen.

## Qualitätskontrolle und Validierung der Messungen

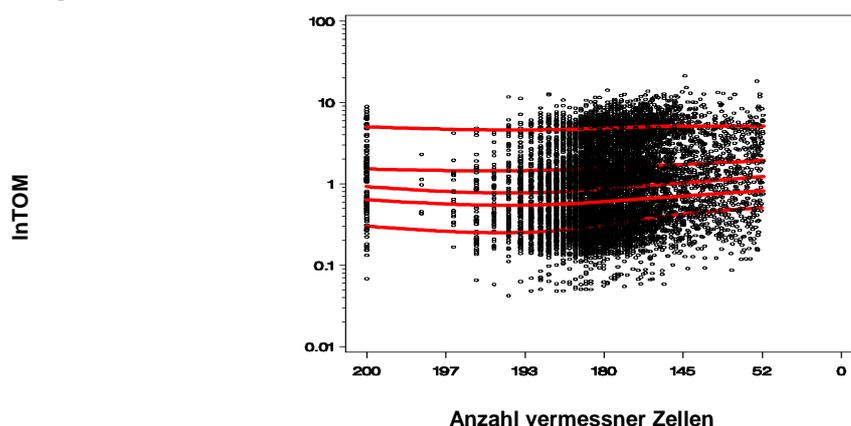
Mit Ausnahme des Initialschadens und des Schadens nach 10 bzw. 60 Minuten Reparatur hinsichtlich InTOM, konnte bei allen experimentellen Konfigurationen ein signifikanter Einfluss der Anzahl Zellen auf den InTOM, als auch auf den logit %DNA beobachtet werden.

Bezüglich **InTOM** konnten i. d. R. signifikant **höhere Messwerte** bei Einzelexperimenten mit **50-170 Zellen** beobachtet werden. Die deutlichste Messwerterhöhung konnte für den **Basis-schaden** beobachtet werden. Standen mehr als 190 Zellen zur Verfügung, so lag der TOM im Mittel bei 0,26 (95%-CI: 0,25-0,28). Standen hingegen weniger als 171 Zellen zur Verfügung so lag der TOM im Mittel bei 0,42 (95%-CI: 0,39-0,44), war also um rund **das 1,62-fache höher**. Für den Initialschaden konnte eine entsprechenden 1,11-fache, für 10-, 30- und 60-Minuten Reparatur eine 1,16-, 1,25- und 1,29-fache Erhöhung beobachtet werden.

Ähnliches gilt für die Messwerte hinsichtlich **%DNA im Schweif**. Anders als beim InTOM konnten hier jedoch i. d. R. **höhere Messwerte** bei Einzelexperimenten mit **bis zu 180 Zellen** beobachtet werden. Für Basisschaden, Initialschaden und 10-, 30- und 60-Minuten Reparatur wurden Erhöhung um das 1,41-, 1,06-, 1,15- 1,11- und 1,10-fache beobachtet (191-200 Zellen versus 50-170 Zellen).

Es zeigt sich somit übereinstimmend in allen experimentellen Konfigurationen eine (meist signifikante) Tendenz zu höheren Messwerten je weniger Zellen zur Auswertung zur Verfügung standen. Dieser Einflussfaktor ist für 2% (InTOM) bzw. 0,7% (logit %DNA) der Variabilität der Messungen verantwortlich, und bedarf daher weitere Berücksichtigung.

**Abbildung 6: Anzahl vermessener Zellen: InTOM**



Die Kurven entsprechen den Mittlere Verlauf je experimenteller Konfiguration von oben nach unten: Initialschaden, nach 10-, 30-, 60-Minuten Reparatur und Basisschaden

## Position der Proben in den Objektträgerwechslern

Einzelexperimenten zum Basis- und zum Initialschaden wurden in jedem Versuch 4x wiederholt, wobei die Positionen der Proben in den Versuchskästen stets dieselben waren. Sowohl die Bestrahlung als auch die Durchführung des COMET-Assays und die Vermessung der Zellen erfolgten daher für Proben an denselben „Positionen“ ähnlich. Als fünfter endogener Faktor wurde daher die Position am Objektträger untersucht. Weder für TOM noch für %DNA im Schweif konnte ein Einfluss der Position beobachtet werden ( $p_{\text{InTOM}}=0,5283$  bzw.  $p_{\text{logit \%DNA}}=0,5765$ ).

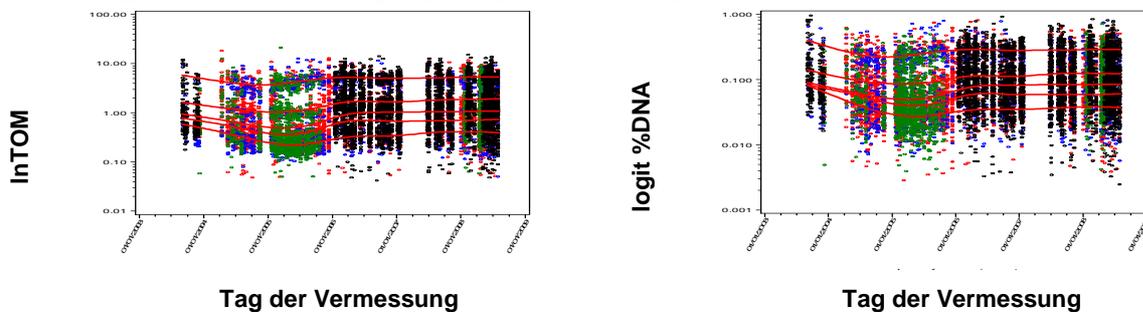
**Zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes**

Die Experimente zu diesem Projekt wurden zwischen dem 4.9.2003 und dem 31.7.2008, also in einem Zeitraum von knapp 5 Jahren durchgeführt. Anfang 2004 und Anfang 2006 wurde das Projekt für 131 bzw. 153 Tage unterbrochen. Obwohl das Protokoll des COMET-Assays und aller zugehörigen Tätigkeiten unverändert blieb, konnte ein Einfluss des zeitlichen Fortganges beobachtet werden (siehe Abbildung 7 und Tabelle 13). Erwähnenswert ist, dass die beiden Unterbrechungen keinen Einfluss auf die Messwerte nahmen. Der zeitliche Fortgang wurde somit als fünfter endogener Faktor untersucht. In der statischen Auswertung wurde das Durchführungsjahr des Experiments berücksichtigt, wobei die Jahre 2003 und 2004, als auch 2006 und 2007 jeweils gemeinsam betrachtet wurden.

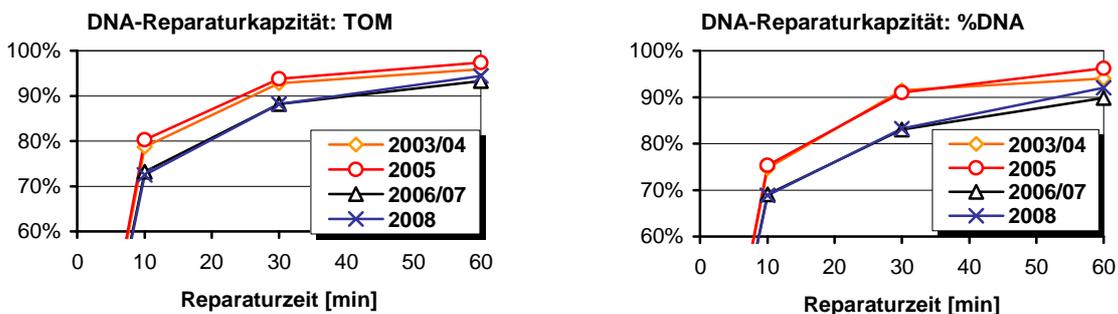
Auf die Messungen aller experimentellen Konfigurationen wurde ein hoch signifikanter Einfluss ( $p < 0.0001$ ) beobachtet. Die Messwerte im Jahr 2005 waren stets niedriger als in den anderen Jahren. Der Basisschaden war von diesem Einflussfaktor am stärksten betroffen. So betrug der mittlere Anteil DNA im Schweif ohne experimentelle Bestrahlung (Basisschaden) in den Jahren 2005 und 2006/07 jeweils 2,9%, in den Jahren 2003/04 4,2% und im Jahr 2008 3,4%, war also um 1,4- bzw. das 1,2-fach höher. Die Unterschiede bezüglich der Zielgröße TOM fielen noch deutlicher aus. So war der mittlere TOM der Jahre 2003/04 1,4-fach, für das Jahr 2008 sogar 1,75-fach höher verglichen mit dem des Jahres 2005.

Der strahlungsinitiierte Initialschaden ist von diesem zeitlichen Effekt am geringsten betroffen, jedoch scheinen hier die kleinsten Werte Mitte/Ende 2004, und nicht wie bei allen anderen experimentellen Konfigurationen Anfang 2005 gemessen worden zu sein. Der mittlere TOM steigen vom Jahre 2003/04 mit 4,08 kontinuierlich über die Jahre zu, auf 5,25 (dem 1,3-fachen) im Jahr 2008 an. Ebenso steigt der mittlere Anteil DNA im Schweif von 25,2% in den Jahren 2003/04 auf 28,6% (dem 1,13-fachen) im Jahr 2008.

**Abbildung 7: zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes**



Die Kurven entsprechen den Mittleren Verlauf je experimenteller Konfiguration von oben nach unten: Initialschaden, nach 10-, 30-, 60-Minuten Reparatur und Basisschaden



## Qualitätskontrolle und Validierung der Messungen

Dies hat klare Auswirkungen auf die Schätzung der DNA-Reparaturkapazität (siehe Abbildung 7 und Tabelle 13). Die Jahre 2003/04 und 2005 unterscheiden sich dabei klar von den Jahren 2006/07 und 2008. Die DRC nach 30 Minuten betrug in der zweiten Projekthälfte hinsichtlich TOM etwa 88% in der ersten Projekthälfte rund 93%, war also um 5%-Punkte höher. Hinsichtlich der %DNA wurde ein Unterschied von 8%-Punkten (erste Hälfte: ~91%, zweite Hälfte ~83%) beobachtet.

Die hier gegebenen Zahlenwerte beziehen sich auf nach Studiengruppen (LK-Patienten, KORA-Kontrollen, Verwandte und Humane Kontrolle) adjustierte Mittelwerte. Dieselben Effekte lassen sich innerhalb der Studiengruppen, vor allem den LK-Patienten und der Humanen Kontrolle –die über den gesamten Projektverlauf COMET-Assays angefertigt wurden – beobachten. Der Einfluss des zeitlichen Fortgangs kann also nicht durch Unterschiede der Studiengruppen erklärt werden.

Dieser Einflussfaktor ist für 7% (lnTOM) bzw. 3,5% (logit %DNA) der Variabilität der Messungen verantwortlich, und bedarf daher weitere Berücksichtigung.

**Tabelle 13: zeitlicher Fortgang des gesamten Projektes:**

| Experiment Konfiguration | Zielgröße* | 2003/04             | 2005                | 2006/07             | 2008                |
|--------------------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 0 y                      | TOM        | 0.35 (0.33-0.37)    | 0.24 (0.23-0.25)    | 0.29 (0.28-0.31)    | 0.35 (0.34-0.37)    |
| 4 Gy / 0 min             |            | 4.08 (3.90-4.27)    | 4.60 (4.44-4.76)    | 4.85 (4.72-4.99)    | 5.25 (5.10-5.40)    |
| 4 Gy / 10 min            |            | 1.15 (1.06-1.23)    | 1.10 (1.04-1.17)    | 1.51 (1.45-1.58)    | 1.70 (1.63-1.78)    |
| 4 Gy / 30 min            |            | 0.62 (0.56-0.68)    | 0.51 (0.47-0.55)    | 0.83 (0.78-0.88)    | 0.93 (0.88-0.99)    |
| 4 Gy / 60 min            |            | 0.50 (0.45-0.56)    | 0.36 (0.33-0.39)    | 0.60 (0.56-0.63)    | 0.63 (0.59-0.67)    |
| 0 min                    | DRC        | 0.0%                | 0.0%                | 0.0%                | 0.0%                |
| 10 min                   |            | 78.7%               | 80.3%               | 73.2%               | 72.5%               |
| 30 min                   |            | 92.8%               | 93.8%               | 88.2%               | 88.2%               |
| 60 min                   |            | 95.9%               | 97.4%               | 93.3%               | 94.4%               |
| 0 Gy                     | %DNA       | 4.2% ( 4.0%- 4.4%)  | 2.9% ( 2.8%- 3.1%)  | 2.9% ( 2.7%- 3.0%)  | 3.4% ( 3.2%- 3.6%)  |
| 4 Gy / 0 min             |            | 25.2% (24.0%-26.4%) | 26.8% (25.9%-27.8%) | 26.7% (25.9%-27.4%) | 28.6% (27.7%-29.5%) |
| 4 Gy / 10 min            |            | 9.6% ( 8.9%-10.3%)  | 8.9% ( 8.4%- 9.4%)  | 10.2% ( 9.8%-10.7%) | 11.2% (10.7%-11.7%) |
| 4 Gy / 30 min            |            | 6.0% ( 5.4%- 6.6%)  | 5.1% ( 4.7%- 5.5%)  | 6.9% ( 6.5%- 7.4%)  | 7.6% ( 7.2%- 8.1%)  |
| 4 Gy / 60 min            |            | 5.4% ( 4.9%- 6.0%)  | 3.9% ( 3.5%- 4.2%)  | 5.3% ( 5.0%- 5.7%)  | 5.4% ( 5.0%- 5.7%)  |
| 0 min                    | DRC        | 0.0%                | 0.0%                | 0.0%                | 0.0%                |
| 10 min                   |            | 74.4%               | 75.3%               | 69.1%               | 68.9%               |
| 30 min                   |            | 91.5%               | 91.0%               | 83.0%               | 83.2%               |
| 60 min                   |            | 94.0%               | 96.2%               | 89.8%               | 92.0%               |

\* adjustiert für Studiengruppe

## Zusammenfassung

---

Insgesamt kann 14,8% der Variabilität in den Messwerten des TOM, bzw. 6,9% des %DNA im Schweif, auf endogene, den Ablauf der Einzelexperimente charakterisierende, Faktoren zurückgeführt werden. Die Hälfte dieses Anteils verfällt dabei auf unbekannte Faktoren im zeitlichen Fortgang der gesamten Untersuchung. Besonders in den Jahre 2004 und 2005 fielen die Messwerte niedriger aus als davor und danach. Dieser Unterschied fällt im gros mit der Verarbeitung der Blutproben für die Fall-Kontroll-Studien einerseits und der Familienstudie andererseits zusammen. Ein Adjustieren der Messwerte für diese endogenen Faktoren ist daher vor der Berechnung der DNA-Reparaturkapazitäten und deren statistischen Auswertung notwendig.

**Tabelle 14: Anrechenbare Anteil der beobachteten Variabilität in den Messwerten**

| <i><b>Einflussgröße</b></i>                                   | <i><b>p-Wert</b></i> | <i><b>erklärter Anteil der SS*</b></i> |                                   |
|---|----------------------|--|-----------------------------------|
|   |                      | <i><b>TOM</b></i>                      | <i><b>%DNA</b></i>                |
| <i>Trend der Messungen innerhalb eines Einzelexperimentes</i> |                      | --                                     | --                                |
| <i>Zeit seit dem Messbeginn des Versuchs (Wartezeit)</i>      | <i>&lt;0.001</i>     | <i>0,7%</i>                            | <i>0,3%</i>                       |
| <i>Dauer der Vermessung eines Einzelexperiments</i>           | <i>&lt;0.001</i>     | <i>4,8%</i>                            | <i>2,1%</i>                       |
| <i>Anzahl vermessener Zellen</i>                              | <i>&lt;0.001</i>     | <i>2,0%</i>                            | <i>2,1%</i>                       |
| <i>Position an den Objektträgerwechslern</i>                  | <i>~0.55</i>         | <i>0,3%</i>                            | <i>0,3%</i>                       |
| <b>gesamt</b>   |                      | <b>7,8%</b>                            | <b>3,4%</b>                       |
| <i>zeitliche Verlauf des gesamten Projektes**</i>             | <i>&lt;0.001</i>     | <i>7,0%</i>                            | <i>3,5%</i>                       |
| <b>gesamt</b>   |                      | <b>14,8%</b><br><i>(~1/7-tel)</i>      | <b>6,9%</b><br><i>(~1/14-tel)</i> |

\* SS: Sum of Squares = Abweichungsquadratsumme ~ Varianz, nach Korrektur für die experimentelle Konfiguration (Basisschaden, Initialschaden, Reparatur nach 10, 30 oder 60 Minuten)

\*\* nach Korrektur für die experimentelle Konfiguration und Unterschiede zwischen den Studiengruppe (BC-Patienten, KORA-Kontrollen, Verwandte und Humane Kontrolle)

### Korrektur für endogenen Faktoren

Die beobachteten Messwerte wurden für Verzerrungen durch die oben beschriebenen endogenen Faktoren korrigiert, bevor DRCs berechnet wurden. Dazu wurden für beide Zielgrößen (lnTOM und logit %DNA) semi-parametrische Modelle (PROC GAM in SAS: generalized additive models) an alle Daten gefittet, da die Form der Verzerrungen unbekannt ist. Eine Begründung für eine etwaige Linearitätsannahme ist nicht gegeben. Die Korrektur für die beobachteten Verzerrungen sollte rein datenorientiert durchgeführt werden.

Für den Basis- und den Initialschaden wurde die Vermessungsdauer (mit  $df=3$ ), der Tag der Vermessung (mit  $df=3$ ), die Anzahl nicht vermessener Zellen (mit  $df=2$ ) und die Position (mit  $df=3$ ) im Versuchskasten als Spline modelliert. Für die experimentelle Konfiguration und die Studiengruppe wurde adjustiert. Die Wartezeit blieb auf Grund ihres geringen Einflusses unberücksichtigt. Für die Messungen während der Reparatur des DNA-Schadens blieb auch die Position unberücksichtigt.

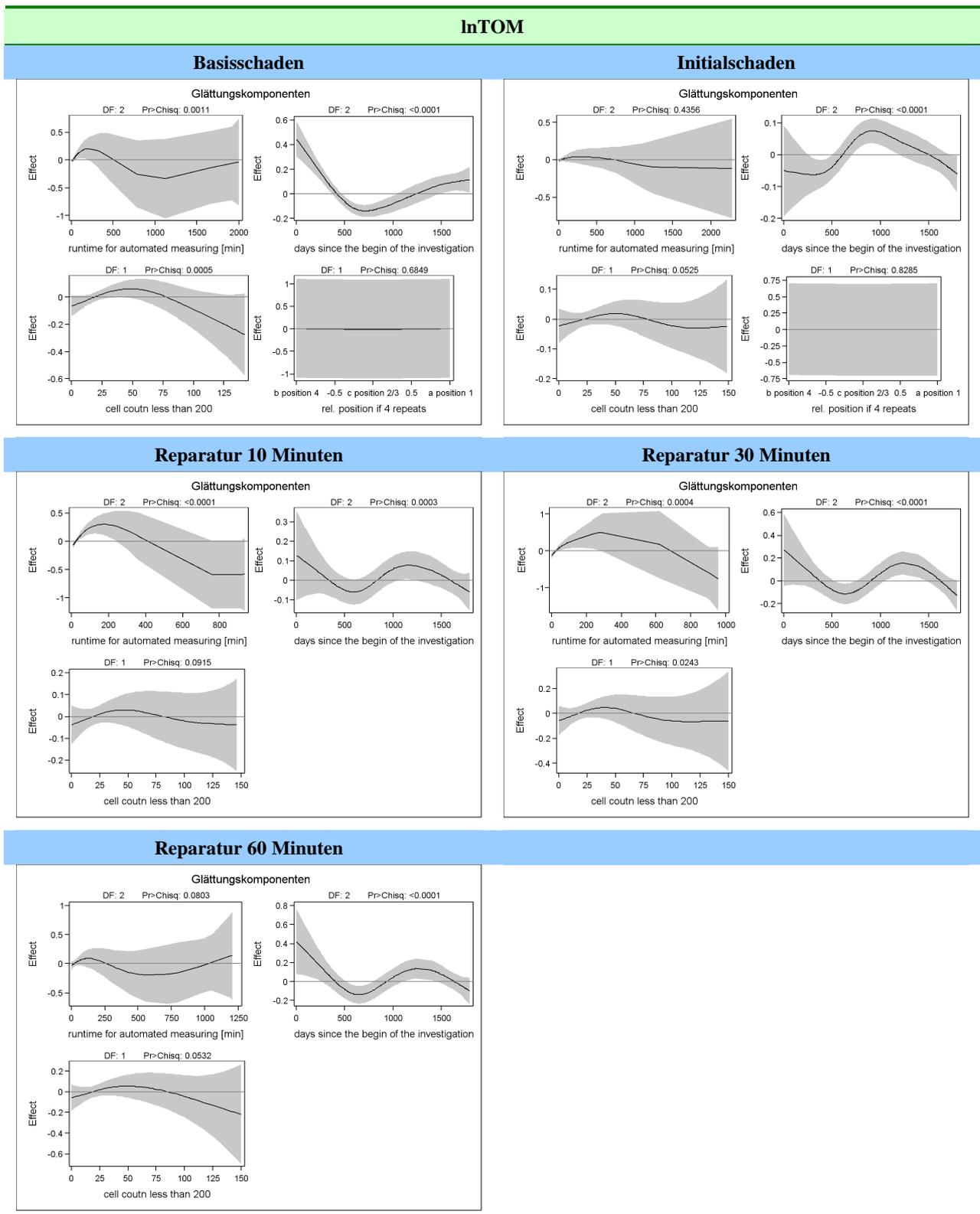
Die Position der Proben in den Versuchskästen erwies sich für lnTOM wie für logit %DNA als nicht signifikant ( $p < 0.5$ ), ebenso die Vermessungsdauer hinsichtlich des Initialschadens ( $p_{\ln\text{TOM}}=0,4356$ ,  $p_{\text{logit \%DNA}}=0.4089$ ).

Da auch die Form der Spline-Schätzer zwischen den experimentellen Konfigurationen inhomogen war (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9) wurde schließlich für jede Zielgröße und jede Konfiguration erneut ein semi-parametrisches Modell, jedoch nur mit den hierfür signifikanten endogenen Faktoren, an die Daten angepasst. Aus den Effektschätzern wurden schließlich Korrekturterme abgeleitet, wobei eine Messung aus 200 Zellen, bei einer Vermessungsdauer  $< 450$  Minuten, im Zeitraum um den 1.1.2005 als Referenzbasis aller Betrachtungen diente.

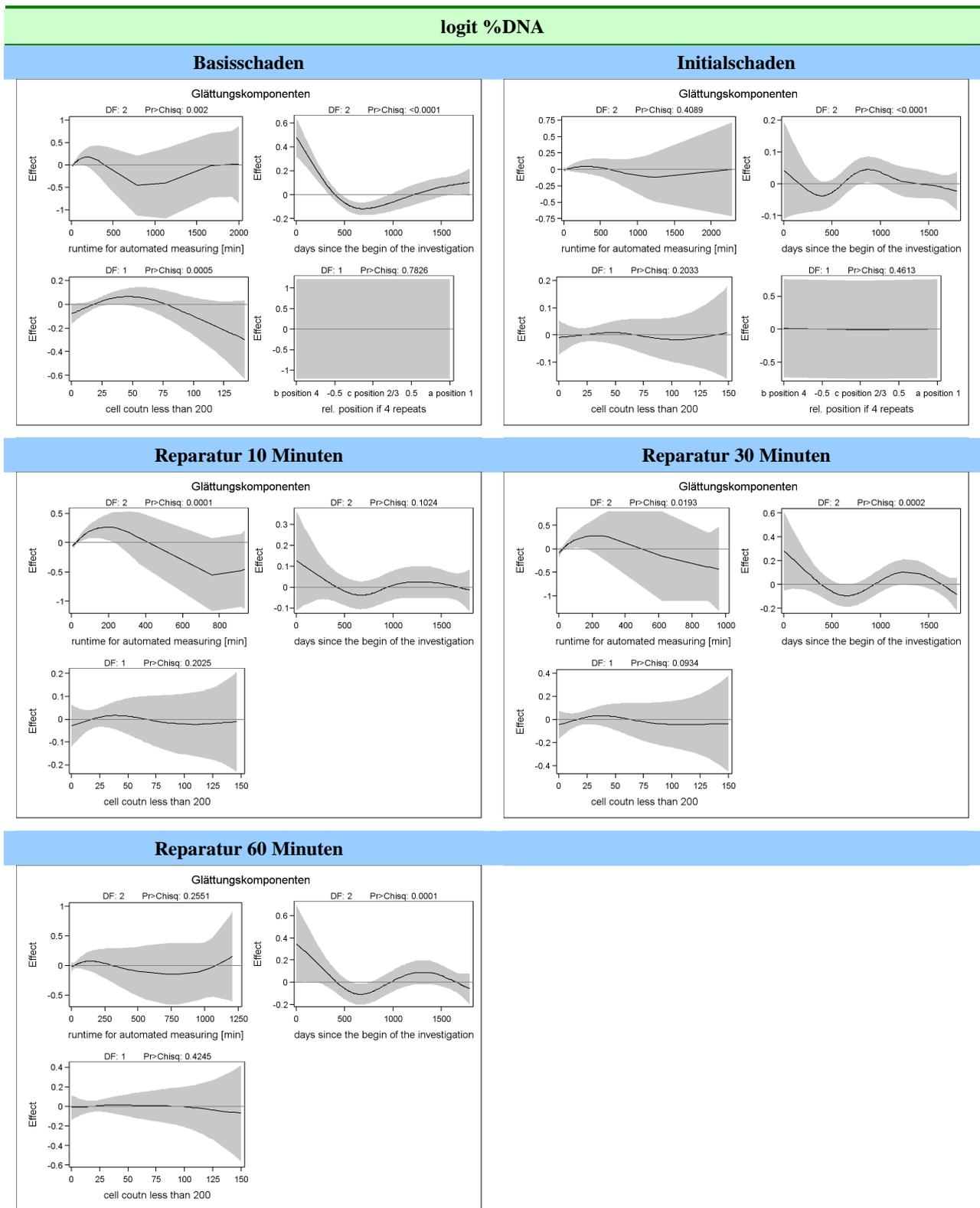
**Tabelle 15: Glättungsanalyse: p-Werte für lnTOM und logit %DNA**

| <i>p-Werte der Glättungsanalyse in GAM</i>      |             |                     |                      |                      |                      |
|---|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>lnTOM</i>                                    | <i>0 Gy</i> | <i>4 Gy / 0 min</i> | <i>4 Gy / 10 min</i> | <i>4 Gy / 30 min</i> | <i>4 Gy / 60 min</i> |
| <i>Spline(Vermessungsdauer)</i>                 | 0.0011      | 0.4356              | <.0001               | 0.0004               | 0.0803               |
| <i>Spline(Tag der Vermessung)</i>               | <.0001      | <.0001              | 0.0003               | <.0001               | <.0001               |
| <i>Spline(Anzahl nicht vermessener Zellen )</i> | 0.0005      | 0.0525              | 0.0915               | 0.0243               | 0.0532               |
| <i>Spline(Position)</i>                         | 0.6849      | 0.8285              |                      |                      |                      |
| <i>logit %DNA</i>                               | <i>0 Gy</i> | <i>4 Gy / 0 min</i> | <i>4 Gy / 10 min</i> | <i>4 Gy / 30 min</i> | <i>4 Gy / 60 min</i> |
| <i>Spline( Vermessungsdauer)</i>                | 0.0020      | 0.4089              | 0.0001               | 0.0193               | 0.2551               |
| <i>Spline(Tag der Vermessung)</i>               | <.0001      | <.0001              | 0.1024               | 0.0002               | 0.0001               |
| <i>Spline(Anzahl nicht vermessener Zellen )</i> | 0.0005      | 0.2033              | 0.2025               | 0.0934               | 0.4245               |
| <i>Spline(Position)</i>                         | 0.7826      | 0.4613              |                      |                      |                      |

**Abbildung 8: Glättungsanalyse: Spline-Schätzer für Vermessungsdauer, Tag der Vermessung, Anzahl nicht vermessener Zellen und Position: InTOM**



**Abbildung 9: Glättungsanalyse: Spline-Schätzer für Vermessungsdauer, Tag der Vermessung, Anzahl nicht vermessener Zellen und Position: logit%DNA**



### III.3 Genotypisierung

Von 941 der 1443 auswertbaren Studienteilnehmern konnten mehr als 90% der Genotypen bestimmt werden, von weiteren 134 mehr als die Hälfte. Bei 61 Studienteilnehmern (45 davon Verwandte der Familienstudie) steht keine genetische Information zur Verfügung.

7 Studienteilnehmer wurden nicht genotypisiert, da ihr Blut nur in der Pilotphase des CO-MET-Assays verwendet wurde. Bei 30 Studienteilnehmern fehlte DNA zur Typisierung, bei 5 war die Qualität der DNA für eine Typisierung zu schlecht.

Bei zwei Personen (Verwandte ersten Grades) wurden identische Genotypen an allen SNPs gemessen (IBS=1). Dies betraf bei Familie 13021 die Personen 250 und 301 (32 Marker im Vergleich). Bei Familie 8086 betraf dies die Personen 250 und 301, wobei die Übereinstimmung nur auf 5 Markern beruht. Auf identische Blutproben kann daher nicht geschlossen werden.

#### III.3.1. Prüfung der Mendelschen Segregation der Familien

Für die Teilnehmer der Familienstudie wurden die Verwandtschaftsbeziehungen auf Basis der verfügbaren Genotypen geprüft. Dabei wurde nach Genotypkonstellationen zwischen einer Person und deren Eltern (Trios) gesucht, die nicht der Mendelschen Vererbungslehre entsprechen (ME: Mendelien Error).

Bei der zur Genotypisierung verwendeten MALDITOF-Methode darf/soll jedoch mit einem Genotypisierungsfehler von  $\sim 0,36\%$  gerechnet werden (Heid 2008). Grob abgeschätzt ist daher bei  $1 - (1 - 0,00363)^3 = 1,089\%$  der ME-Prüfungen eine auf Genotypisierungsfehler basierende ME zu erwarten. Genotypisiert wurden 70 SNPs. Bei rund 50 (von maximal 68) möglichen ME-Prüfungen pro Person ist es zu 99,998% wahrscheinlich, 0 bis 5 MEs (0-10%) zu beobachten. Bei nur 10 möglichen ME-Prüfungen pro Person ist es zu 99,985% wahrscheinlich, 0 bis 2 MEs (0-20%) zu beobachten.

Zu beachten gilt, dass dies nur eine grobe Abschätzung der zu erwartenden Anzahl MEs ist. Zusätzliche Hinweise zur Unterscheidung von tatsächlichen MEs und Genotypisierungsfehlern können aus der Betrachtung der genetischen Information der gesamten Familien gewonnen werden.

Aus dieser Betrachtung haben wir folgendes Kriterium für die genetische Prüfung von Verwandtschaftsbeziehungen aufgestellt:

- Bei mehr als 10% ME wird die gesamte genetische Information der Familie betrachtet. Lassen sich die MEs nicht auf Genotypisierungsfehlern zurückführen, so wird die angegebene Verwandtschaftsbeziehung der Person verworfen.
- Bei weniger als 10 MEs werden diese als Genotypisierungsfehler betrachtet.
- Bei weniger als 10 zur ME-Prüfung verfügbaren SNPs wird als Grenzwert 20% MEs verwendet.

Bei 28 Studienteilnehmern (1,9% von 1443) konnte genetisch die angegebene Familienbeziehung nicht bestätigt werden, deren Genotypen wurden nicht in die Datenbank aufgenommen.

Bei den **Familien 16032** (3 Personen) und **32004** (5 Personen) war die Indexperson nicht blutsverwandt mit den anderen Familienmitgliedern. Beide Familien wurden von der Familienstudie ausgeschlossen.

## Genotypisierung

Bei Familie **8041** (8 Personen) war zwar die Indexperson nicht blutsverwandt mit Eltern und Geschwistern, jedoch wurden der Partner und zwei gemeinsame Kinder in die Studie aufgenommen. Diese Familie wurde daher auf eine Eltern-Kind-Familie (4 Personen) reduziert.

Bei Familie **8086** (8 Personen) war die Indexperson nicht blutsverwandt mit Eltern und Geschwistern und dem einzigen Kind. Diese Familie wurde daher auf eine Eltern-Kind-Familie (2 Personen) aus dem Vater und dem Geschwister der Indexperson reduziert.

Die übrigen Personen sind zwei Väter, 8 Geschwister und 3 Kinder. Diese Personen werden nicht in der Familienstudie berücksichtigt.

Person 13021301 wird gänzlich aus der Studie eliminiert, da das verwendete Blut mit dem der Mutter (Person 250) identisch ist.

**Tabelle 16 Callrate pro Person**

| Callrate per Person | Callrate SNPs |           |          |           |          |           |            |            |            |            |
|---------------------|---------------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
|                     | 0%            |           | <10%     |           | 10%-50%  |           | 50%-90%    |            | 90%-100%   |            |
| 0%                  | 61            | 100%      |          |           |          |           |            |            |            |            |
| <10%                |               |           | 2        | 100%      |          |           |            |            |            |            |
| 10%-50%             |               |           |          |           | 4        | 80%       | 1          | 20%        |            |            |
| 50%-90%             |               |           |          |           | 1        | 0%        | 133        | 17%        | 659        | 83%        |
| 90%-100%            |               |           |          |           |          |           |            |            | 282        | 100%       |
| <b>Gruppe</b>       |               |           |          |           |          |           |            |            |            |            |
| Fall (LK-Patient)   | 4             | 2%        | 2        | 1%        | 2        | 1%        | 38         | 21%        | 131        | 74%        |
| Indexpatient        | 9             | 5%        |          |           |          |           | 17         | 9%         | 159        | 86%        |
| KORA-Kontrolle      | 3             | 2%        |          |           | 1        | 1%        | 46         | 27%        | 119        | 70%        |
| Verwandter          | 45            | 7%        |          |           | 2        | 0%        | 33         | 5%         | 532        | 87%        |
| <b>gesamt</b>       | <b>61</b>     | <b>5%</b> | <b>2</b> | <b>0%</b> | <b>5</b> | <b>0%</b> | <b>134</b> | <b>12%</b> | <b>941</b> | <b>82%</b> |

**Tabelle 17 Gründe für Ausfall bei Genotypisierung**

| Gruppe            | Ausfallgrund |            |                   |           |                                      |            |             |            |           |             |
|-------------------|--------------|------------|-------------------|-----------|--------------------------------------|------------|-------------|------------|-----------|-------------|
|                   | fehlende DNA |            | Komplett-ausfall* |           | Prüfung der Familienstruktur negativ |            | Pilotstudie |            | gesamt    |             |
| Fall (LK-Patient) | 4            | 100%       |                   |           |                                      |            |             |            | 4         | 6%          |
| Indexpatient      | 5            | 56%        | 1                 | 11%       | 5                                    | 42%        | 1           | 11%        | 12        | 17%         |
| KORA-Kontrolle    | 3            | 100%       |                   |           |                                      |            |             |            | 3         | 4%          |
| Verwandter        | 18           | 40%        | 4                 | 9%        | 24                                   | 46%        | 6           | 13%        | 52        | 73%         |
| <b>gesamt</b>     | <b>30</b>    | <b>49%</b> | <b>5</b>          | <b>7%</b> | <b>29</b>                            | <b>41%</b> | <b>7</b>    | <b>10%</b> | <b>71</b> | <b>100%</b> |

- aufgrund schlechter DNA-Qualität

### III.3.2. Beschreibung der genetischen Marker

Insgesamt wurden an 70 genetischen Markern (alles SNPs) Genotypen bestimmt. Bei 14 Markern schlug die Typisierung mit der MALDI-TOF-Methode komplett fehl, bei 4 weiteren wurden nur Callrates <75% erzielt (siehe Tabelle 1). Für die statistische Auswertung standen daher 52 SNPs in 12 ausgewählten Genen zur Verfügung. 35 dieser Marker sind tagging-SNPs.

Bei drei der 52 Marker (rs552126  $p=0,0413$ ; rs3017077  $p=0,0397$  und rs25489  $p=0,0466$ ) konnte unter den KORA-Kontrollen ein signifikanter Verstoß gegen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) beobachtet werden. Da bei 52 Tests auf dem 5%-Signifikanzniveau mit 2,6 falsch signifikanten Ergebnissen zu rechnen ist, kann bei diesen Marken nicht abschließend ein Verstoß attestiert werden. Es dürfen daher sowohl wesentliche genetische Substrukturen an diesen Markern in der Bevölkerung als auch systematischen Typisierungsfehler vernachlässigt werden.

### III.3.3. Blöcke mit erhöhtem LD (Kopplungsungleichgewicht) der genetischen Marker

Zur Bestimmung der Blockstruktur zwischen den genomischen Markern eines Genes wurde das Kopplungsungleichgewicht (LD: linkage disequilibrium) mit Hilfe des LD-Maßes  $D'$  ermittelt. Anhand der Konfidenzintervall-Methode nach Gabriel et al wurden Blöcke definiert und die entsprechenden Haplotyp-Häufigkeiten geschätzt. Des Weiteren mussten die Marker folgende Kriterien erfüllen: minimaler p-Wert für HWE: 0.0010, minimale Anteil bestimmter Genotypen (call rate) >75%, minimale Allelhäufigkeit (minor allele freq.: MAF) 0.1%. Bei hoher Markerdichte wurde die minimale MAF auf 0.3 bzw. 0.4 erhöht (dies war bei ATM bzw. XRCC4 der Fall).

Alle Berechnungen beruhen auf den Genotypverteilungen der Kontrollpersonen (KORA - Studienpopulation).

### *BER*

---

Die Marker des Gens **hOGG1**, rs125701 und rs2072668, stehen nicht im LD zueinander.

Die Marker des Genes **XRCC1** können zwei LD-Blöcken zugeordnet werden. Der Marker rs2682585 zeigt zwar mit den Markern von Block 1, nicht jedoch mit den Markern des benachbarten Blocks 2 eine hohe LD.

Für die Marker von **PARP1** konnte keine Blockstruktur beobachtet werden.

## Genotypisierung

---

### *NHEJ*

---

Drei Marker des Genes **Lig4** stehen in starker LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block. Der Marker rs1805388 steht jedoch nur mit dem benachbarten Marker rs1805386 in LD.

Alle Marker des Genes **MRE11** stehen in erhöhtem LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block.

Die Marker des Genes **NBS1** stehen in starker LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block.

Für beide Marker von **RAD50** konnte keine ausgeprägte LD beobachtet werden.

Die Marker des Genes **XRCC4** stehen in starker LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block.

Die Marker des Genes **ATM** stehen in starker LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block.

### *MMR*

---

Die Marker des Genes **MSH2** stehen in starker LD zueinander und bilden einen einzelnen LD-Block.

Die drei Marker von PCNA stehen in keinem ausgeprägten LD zueinander.

### *Apoptose*

---

Die beiden Marker des Gens **TGFB1**, rs1800469 und rs2317130, stehen in erhöhter LD zueinander und bilden einen LD-Block.

### III.4 Fall-Kontroll-Studie

#### III.4.1. Methoden

Als **Maß der DNA-Schädigung** wurden die für den COMET-Assay empfohlenen Endpunkte (Lovell und Omori, 2008) lnTOM und der logit %DNA verwendet.

Als **Zielgrößen der Strahlenempfindlichkeit** wurden die Messungen zu fünf Zeitpunkten vor bzw. nach der experimentellen Bestrahlung getrennt betrachtet: Basisschaden (Messungen vor der Bestrahlung), strahlungsinduzierter Initialschaden (Messungen direkt nach der Bestrahlung) und den DRCs (DNA-Reparatur-Kapazitäten: 10, 30 bzw. 60 Minuten nach der Bestrahlung).

#### *Korrelationsstruktur der Zielgrößen untereinander*

---

Die Rangkorrelation  $\rho$  der untersuchten Zielgrößen wurden für beide Schadensmaße nach Spearman, partiell zum Krankheitsstatus berechnet. Ebenso wurde die Korrelation zwischen lnTOM und logit %DNA pro Zielgröße berechnet.

#### *Strahlenempfindlichkeit als Prädiktor für Lungenkrebs*

---

Eine Assoziation jeder Zielgröße zu Lungenkrebs wurde mit logistischen Modellen getestet. Dabei wurden Odds-Ratios (OR) und zugehörige 95%-Konfidenzintervalle (95%.CI), adjustiert für Alter, Geschlecht und Rauchen (pack years) geschätzt. Die Einheit der OR für den Basis- und den Initialschaden entspricht dabei dem Doppelten der empirischen Standardabweichung (2s). Die OR der DNA-Reparatur-Kapazität sind in 10%-Punkten angegeben. Mittels „Backward“-Selektion wurden alle nicht relevanten Zielgrößen aus dem Modell eliminiert (Auswahlkriterium: p-Wert<0,05). Für alle verbleibenden Zielgrößen (dies war nur die DNA-Reparatur-Kapazitäten nach 30 Minuten hinsichtlich lnTOM) wurde der univariate Effekt, jedoch weiterhin adjustiert nach Alter, Geschlecht und Rauchen, geschätzt und auf statistische Signifikanz getestet. Alle Berechnungen wurden für beide Schadensmaße getrennt durchgeführt.

#### *Genetische Assoziation zu Lungenkrebs unter Berücksichtigung der Strahlenempfindlichkeit*

---

Alle genomischen Marker wurden einzeln auf Assoziation zu Lungenkrebs, unadjustiert mit dem exaktem BWS-Test (Baumgartner-Weiss-Schindler Test, Neuhaus 2002) getestet. Als exakter Test ist für diese Methode keinerlei Verteilungsannahme einer Teststatistik notwendig. Ebenso wurde eine mögliche Assoziation mittels logistischer Regression, adjustiert für Rauchen (pack years) und der DRC<sub>30 Minuten</sub> getestet. Genotypische Odds-Ratios (OR) und zugehörige 95%-Konfidenzintervalle (95%-CI) wurden in einem ko-dominanten Model ge-

## Fall-Kontroll-Studie

---

schätzt. Ebenso wurden dominante, log-additive und rezessive Modelle getestet und geschätzt.

### *Einfluss von Alter, Geschlecht und Krankheitsstatus auf die Strahlenempfindlichkeit*

---

Der Einfluss von Alter und Geschlecht sowie dem Krankheitsstatus (LK-Patienten vs. Kontrollen) wurden für alle Zielgrößen in linearen Regressionsmodellen untersucht. Ein Alterseffekt wurde im Gesamtkollektiv sowie für jede Studiengruppe separat modelliert.

### *Einfluss genetische Marker auf die Strahlenempfindlichkeit*

---

Der Einfluss eines genomischen Markers auf eine der fünf Zielgrößen wurde in einem linearen Model, adjustiert für Alter und Geschlecht und Lungenkrebserkrankung als koinstanter Effekt getestet und geschätzt. Ebenso wurden dominante, log-additive und rezessive Effekte getestet. Adjustierte, genotypische Effekte und deren 95%-Konfidenzintervall wurden geschätzt. Alle Berechnungen wurden für beide Schadensmaße getrennt durchgeführt.

Für die erzielten p-Werte wurden je Schadensmaß und Zielgröße ebenso die FDR (false discovery rate) nach der in der Prozedur PROC MULTTEST von SAS<sup>®</sup> 9.1 implementierten Methode grob abgeschätzt.

#### **III.4.2. Beschreibung der Studienpopulation**

In der Fall-Kontroll-Studie wurden 123 männliche und 54 weibliche LK-Patienten (gesamt 177 Fällen) mit einem mittlerem Alter von 45,6 Jahren, mit 169 nach Alter und Geschlecht gematchten krebsfreien Kontrollpersonen verglichen.

Nur 5% der Fälle gaben an, noch nie eine Zigarette geraucht zu haben. Unter Kontrollen waren diese 41%. Das mittlere Alter bei Rauchbeginn war unter Fällen wie Kontrollen ~17 Jahre. 82% der Fälle aber nur 28% der Kontrollen waren Raucher. Die mittlere, lebenslang konsumierte Tabakmenge war unter den Fällen mit ~27 Packyears etwa 2 ½-mal so hoch wie die der Kontrollen mit ~11 Packyears (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18 Beschreibung der Studienteilnehmer: Alter, Geschlecht und Rauchverhalten**

|                                   |  | Fälle (n=177) |               |          | Kontrollen (n=169) |               |          |
|-----------------------------------|--|---------------|---------------|----------|--------------------|---------------|----------|
|                                   |  | N             |               |          | N                  |               |          |
| <b>Geschlecht</b>                 | <i>unbekannt</i>                       | --            | --            |          | 2                  | 1%            |          |
|                                   | <i>männlich</i>                        | 123           | 70%           |          | 108                | 64%           |          |
|                                   | <i>weiblich</i>                        | 54            | 30%           |          | 59                 | 35%           |          |
|                                   |  | <b>N</b>      | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>           | <b>Mittel</b> | <b>s</b> |
| <b>Alter</b>                      |  | 177           | 45.6          | 4.0      | 166                | 45.7          | 4.3      |
| <b>Raucher-Status</b>             | <i>nicht bestimmbar</i>                | 8             | 5%            |          | 2                  | 1%            |          |
|                                   | <i>Nieraucher</i>                      | 9             | 5%            |          | 70                 | 41%           |          |
|                                   | <i>Gelegenheitsraucher<sup>s</sup></i> | 4             | 2%            |          | --                 | --            |          |
|                                   | <i>Ex-Raucher</i>                      | 11            | 6%            |          | 50                 | 30%           |          |
|                                   | <i>Raucher</i>                         | 145           | 82%           |          | 47                 | 28%           |          |
|                                   |  | <b>N</b>      | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>           | <b>Mittel</b> | <b>s</b> |
| <b>Alter bei erster Zigarette</b> | <i>gesamt</i>                          | 160           | 16.4          | 2.7      | 97                 | 17.4          | 3.6      |
|                                   | <i>Männlich</i>                        | 114           | 16.5          | 2.9      | 66                 | 16.9          | 3.1      |
|                                   | <i>Weiblich</i>                        | 46            | 16.0          | 2.1      | 31                 | 18.6          | 4.4      |
| <b>Packyears</b>                  | <i>gesamt</i>                          | 168           | 27.3          | 17.7     | 137                | 10.6          | 16.4     |
|                                   | <i>männlich</i>                        | 116           | 28.9          | 18.1     | 83                 | 12.1          | 19.0     |
|                                   | <i>weiblich</i>                        | 52            | 23.8          | 16.1     | 54                 | 8.5           | 11.2     |

<sup>s</sup> Gelegenheitsraucher sind Raucher mit <1 Packyears, die mehr als ein Jahr geraucht haben  
s Standardabweichung

### Beschreibung der Strahlenempfindlichkeit in der Studienpopulation

Der Basisschaden bemessen am lnTOM betrug rund -1.1 (Median), der strahlungsinduzierte Initialschaden 1,6. Bemessen am logit %DNA betrug der Basisschaden -3,3 (also waren ~4% DNA im Tail), der Initialschaden -1,3 (also waren ~22% DNA im Tail).

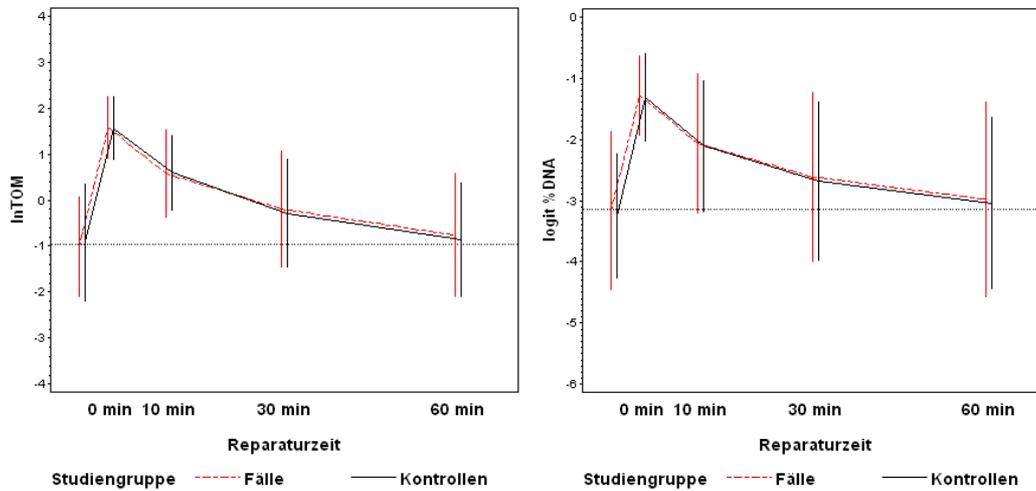
Wie aus Abbildung 10 und Tabelle 19 zu erkennen, wurde im Mittel selbst nach 60 Minuten der strahlungsinduzierte Schaden nicht vollständig repariert. Bemessen am lnTOM wie am logit %DNA hatten die Hälfte der Studienteilnehmer (mediane Werte) nach 10 Minuten ~40%, nach 30 Minuten ~70% und nach 60 Minuten ~90% des Schadens repariert. Einen Unterschied zwischen den Fällen und Kontrollen lies sich nur hinsichtlich lnTOM beobachten: Nach 60 Minuten hat die Hälfte der LK-Patienten mindestens 90% des strahleninduzierten Schadens, die Hälfte der Kontrollen mindestens 95% repariert.

Es zeigte sich ferner ein Anstieg der Varianz der Messwerte mit der Reparaturzeit von  $s^2_{\text{Initialschaden}}=0,34^2 / 0,34^2$  zu  $s^2_{\text{Initialschaden}}=0,64^2 / 0,75^2$  (lnTOM / logit %DNA), also auf das 3 bis 5-fache. Die Varianz des Basisschadens ist mit  $s^2=0,59^2 / 0,58^2$  etwas geringer als die nach 60 Minuten Reparatur. Werden die Messwerte zu DRCs (DNA-Reparaturkapazitäten) verrechnet, sinkt die Varianz der Zielgrößen. Für beide Studiengruppen gemeinsam betrug die Varianz bemessen am lnTOM der  $\text{DRC}_{10 \text{ Minuten}}$  0,16<sup>2</sup> bzw.  $\text{DRC}_{60 \text{ Minuten}}$  1,42<sup>2</sup>, war also um das 3-fache höher. Bemessen am logit %DNA betrug die Varianz der  $\text{DRC}_{10 \text{ Minuten}}$  und des

## Fall-Kontroll-Studie

$DRC_{60 \text{ Minuten}} 0,52^2$ , war also gleich groß. Einen Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen lies sich auch für die Varianz der Messgrößen nicht erkennen.

Abbildung 10: Verlauf der DNA-Schadens: Vergleich von Fällen und Kontrollen



dargestellt sich die Mittelwerte +/- Standardabweichung für Fälle und Kontrollen

Tabelle 19 Beschreibung der Studienteilnehmer: Strahlenempfindlichkeit

|                       | Fälle |        |      |        | Kontrollen |        |      |        | Gesamt |        |      |        |
|-----------------------|-------|--------|------|--------|------------|--------|------|--------|--------|--------|------|--------|
|                       | n     | Mittel | s    | Median | n          | Mittel | s    | Median | n      | Mittel | s    | Median |
| <b>Basisschaden</b>   | 174   | -1.02  | 0.54 | -1.10  | 165        | -0.92  | 0.63 | -1.10  | 339    | -0.97  | 0.59 | -1.10  |
| <b>Initialschaden</b> | 176   | 1.58   | 0.33 | 1.58   | 163        | 1.56   | 0.34 | 1.57   | 339    | 1.57   | 0.34 | 1.57   |
| <b>10 min</b>         | 174   | 0.57   | 0.48 | 0.54   | 163        | 0.60   | 0.40 | 0.60   | 337    | 0.59   | 0.44 | 0.57   |
| <b>30 min</b>         | 172   | -0.20  | 0.63 | -0.17  | 164        | -0.28  | 0.58 | -0.32  | 336    | -0.24  | 0.61 | -0.22  |
| <b>60 min</b>         | 173   | -0.76  | 0.66 | -0.82  | 162        | -0.86  | 0.62 | -0.90  | 335    | -0.81  | 0.64 | -0.88  |
| <b>InTOM</b>          |       |        |      |        |            |        |      |        |        |        |      |        |
| <b>DRC</b>            |       |        |      |        |            |        |      |        |        |        |      |        |
| <b>10 min</b>         | 170   | 0.39   | 0.17 | 0.40   | 161        | 0.40   | 0.16 | 0.39   | 331    | 0.40   | 0.16 | 0.39   |
| <b>30 min</b>         | 169   | 0.69   | 0.20 | 0.67   | 161        | 0.76   | 0.20 | 0.74   | 330    | 0.73   | 0.21 | 0.71   |
| <b>60 min</b>         | 170   | 0.91   | 0.20 | 0.90   | 160        | 1.02   | 0.30 | 0.95   | 330    | 0.96   | 0.26 | 0.92   |
| <b>logit %DNA</b>     |       |        |      |        |            |        |      |        |        |        |      |        |
| <b>Basisschaden</b>   | 174   | -3.17  | 0.64 | -3.22  | 165        | -3.26  | 0.50 | -3.29  | 339    | -3.21  | 0.58 | -3.27  |
| <b>Initialschaden</b> | 176   | -1.28  | 0.32 | -1.26  | 163        | -1.32  | 0.35 | -1.29  | 339    | -1.30  | 0.34 | -1.27  |
| <b>10 min</b>         | 174   | -2.07  | 0.57 | -2.06  | 163        | -2.11  | 0.53 | -2.09  | 337    | -2.09  | 0.55 | -2.07  |
| <b>30 min</b>         | 172   | -2.62  | 0.69 | -2.58  | 164        | -2.68  | 0.64 | -2.63  | 336    | -2.65  | 0.67 | -2.60  |
| <b>60 min</b>         | 173   | -2.98  | 0.79 | -3.04  | 162        | -3.04  | 0.70 | -3.08  | 335    | -3.01  | 0.75 | -3.06  |
| <b>DRC</b>            |       |        |      |        |            |        |      |        |        |        |      |        |
| <b>10 min</b>         | 170   | 0.50   | 0.66 | 0.42   | 161        | 0.42   | 0.31 | 0.38   | 331    | 0.46   | 0.52 | 0.41   |
| <b>30 min</b>         | 169   | 0.86   | 1.20 | 0.74   | 161        | 0.74   | 0.36 | 0.69   | 330    | 0.80   | 0.90 | 0.72   |
| <b>60 min</b>         | 170   | 0.96   | 0.59 | 0.88   | 160        | 0.94   | 0.43 | 0.88   | 330    | 0.95   | 0.52 | 0.88   |

s Standardabweichung, DRC...DNA-Reparaturkapazität

### III.4.3. Ergebnisse

#### *Korrelationsstruktur der Zielgrößen untereinander*

Die Korrelation der Zielgrößen für lnTOM bzw. logit %DNA untereinander erreichte maximal  $\rho=0,47$  (lnTOM: Basis- vs. strahlungsinduzierter Initialschaden) und darf daher stets als schwach bis moderat bezeichnet werden ( $\rho < 0,5$ ).

Die paarweise Korrelation der Zielgrößen des lnTOM und des logit %DNA lag zwischen  $\rho=0,39$  für die Reparatur nach 10 Minuten und  $\rho=0,75$  für den strahleninduzierten Initialschaden. Alle diese Korrelationen sind signifikant für  $\rho > 0$ . Die Messungen des Basis- und des strahlungsinduzierter Initialschadens am lnTOM bzw. am logit %DNA zeigen dabei die höchste, wenn auch nur moderate Übereinstimmung ( $0,5 \leq \rho < 0,8$ ). Die Messungen der Reparaturfähigkeit am lnTOM bzw. am logit %DNA sind paarweise nur schwach miteinander korreliert (siehe Tabelle 20). Es darf daher davon ausgegangen werden, dass dem lnTOM und dem logit %DNA nicht dieselbe Information über Strahlenschäden inne wohnen. Es dürfen im Weiteren unterschiedliche Ergebnisse bezüglich lnTOM und logit %DNA erwartet werden.

#### *Strahlenempfindlichkeit als Prädiktor für Lungenkrebs*

Von den 10 betrachteten Messwerten der Strahlenempfindlichkeit erwiesen sich die Reparaturkapazität nach 30 Minuten ( $p=0.0609$ ) sowie nach 60 Minuten ( $p=0.0886$ ), bemessen am lnTOM, in einem Modell mit allen Schadens/Reparaturmaßen (je Zielgröße) als beinahe statistisch signifikant. Univariat konnte die Reparaturkapazität nach 30 Minuten als signifikanter Prädiktor für Lungenkrebs in jungen Jahren beobachtet werden. Die geschätzte OR für eine 10%ige Steigerung der DRC betrug 0.86 (95%-CI: 0,75 – 1,00). Anders ausgedrückt: je 10% geringere DRC steigt die Chance an Lungekrebs zu erkranken um das 1.16-fache (95%-CI: 1,00 – 1.33). Eine Differenz von 10% DRC entspricht grob dem beobachteten Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen.

In diesem Modell würde für Rauchen eine OR von 3.40 (95% CI: 2,38 – 4,88) je 20 Packyears geschätzt. Der Einfluss der Reparaturkapazität auf das Risiko einer Lungenkrebserkrankung in jungen Jahren entspricht damit etwa  $\frac{1/0,86}{3,4/20} \approx 10$  packyears, rund der mittleren Rauchexposition unter den Kontrollen.

**Tabelle 20** Rangkorrelation der Zielgrößen zur Strahlenempfindlichkeit: Fall-Kontroll-Studie

| <b>InTOM</b>                         |                     |                       |                          |                         |                         |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                      | <b>Basisschaden</b> | <b>Initialschaden</b> | <b>Reparatur 10 min.</b> | <b>Reparatur 30 min</b> | <b>Reparatur 60 min</b> |
| Basisschaden                         | 1.00                | 0.47<br><.0001        | 0.28<br><.0001           | 0.13<br>0.0220          | 0.35<br><.0001          |
| strahlungsinduzierter Initialschaden |                     | 1.00                  | 0.43<br><.0001           | -0.01<br>0.8686         | 0.13<br>0.0226          |
| Reparatur 10 min                     |                     |                       | 1.00                     | 0.16<br>0.0029          | 0.35<br><.0001          |
| Reparatur 30 min                     |                     |                       |                          | 1.00                    | 0.26<br><.0001          |
| Reparatur 60 min                     |                     |                       |                          |                         | 1.00                    |
| <b>logit %DNA</b>                    |                     |                       |                          |                         |                         |
| Basisschaden                         | 1.00                | 0.28<br><.0001        | 0.32<br><.0001           | 0.33<br><.0001          | 0.38<br><.0001          |
| strahlungsinduzierter Initialschaden |                     | 1.00                  | 0.24<br><.0001           | 0.07<br>0.2262          | -0.01<br>0.7923         |
| Reparatur 10 min                     |                     |                       | 1.00                     | 0.12<br>0.0313          | 0.23<br><.0001          |
| Reparatur 30 min                     |                     |                       |                          | 1.00                    | 0.28<br><.0001          |
| Reparatur 60 min                     |                     |                       |                          |                         | 1.00                    |
| <b>Logit %DNA</b>                    |                     |                       | <b>InTOM</b>             |                         |                         |
| Basisschaden                         | 0.65<br><.0001      |                       |                          |                         |                         |
| strahlungsinduzierter Initialschaden |                     | 0.75<br><.0001        |                          |                         |                         |
| Reparatur 10 min                     |                     |                       | 0.39<br><.0001           |                         |                         |
| Reparatur 30 min                     |                     |                       |                          | 0.51<br><.0001          |                         |
| Reparatur 60 min                     |                     |                       |                          |                         | 0.49<br><.0001          |

Partielle Korrelationskoeffizienten nach Spearman  $\rho$ , darunter  $p$ -Wert für  $\rho=0$

**Tabelle 21** Strahlenempfindlichkeit als Prädiktoren für Lungenkrebs

| <b>Messwert</b>                      | <b>Einheit für OR</b> | <b>InTOM</b>                 |                           | <b>logit%DNA</b>             |                           |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                                      |                       | <b>OR<sup>§</sup> 95%-CI</b> | <b>p-Wert<sup>§</sup></b> | <b>OR<sup>§</sup> 95%-CI</b> | <b>p-Wert<sup>§</sup></b> |
| Basisschaden                         | je 1,08/1,12*         | 1.1 ( 0.6 - 2.2 )            | 0.8021                    | 1.1 ( 0.6 - 2.1 )            | 0.7798                    |
| strahlungsinduzierter Initialschaden | je 0,68/0,68*         | 1.3 ( 0.7 - 2.4 )            | 0.4898                    | 1.5 ( 0.9 - 2.7 )            | 0.1595                    |
| Reparatur 10 min                     | je 10%                | 1.1 ( 0.9 - 1.3 )            | 0.4410                    | 1.0 ( 0.9 - 1.1 )            | 0.6894                    |
| Reparatur 30 min                     | je 10%                | 0.9 ( 0.7 - 1.0 )            | 0.0609                    | 1.0 ( 1.0 - 1.0 )            | 0.5593                    |
| Reparatur 60 min                     | je 10%                | 0.9 ( 0.8 - 1.0 )            | 0.0886                    | 1.0 ( 1.0 - 1.1 )            | 0.5685                    |
| <b>univariates Model</b>             |                       |                              |                           |                              |                           |
| Reparatur 30 min                     | je 10%                | 0.86 ( 0.75 - 1.00 )         | * 0.0445                  |                              |                           |

<sup>§</sup> Adjustiert für Alter, Geschlecht und Rauchen (packyears)

\* Einheit für OR entspricht 2x der in der empirischen Standardabweichung.

---

**Genetische Assoziation zu Lungenkrebs unter Berücksichtigung der Strahlenempfindlichkeit**

---

Für 8 Marker aus 5 Genen konnte ein signifikanter Einfluss auf das Risiko einer Lungenerkrankung beobachtet werden. Für die Marker rs9587525 und rs1805388 aus dem Gen LIG4 zeigte sich diese Assoziation jedoch nur unadjustiert für Alter, Geschlecht und Rauchen (siehe BWS-Test in Tabelle 22).

**BER**

Im Gen **hOGG1** zeigte der Marker **rs2072668** mit OR~1,8 ein signifikant erhöhtes Risiko für Lungenkrebs ( $p=0,0444$ ) der Heterozygoten gegenüber Wildtypträgern, auch im dominanten Modell (OR=1,8 95%-CI: 1,0-3,1;  $p=0,0389$ ).

Der benachbarte Marker **rs125701** erweist sich im co-dominanten Modell als signifikant mit Lungenkrebs assoziiert ( $p=0,0452$ ). Die geschätzte OR für Heterozygote gegenüber Wildtypträgern ist der von rs2072668 vergleichbar (1,6 95%-CI: 0,9-2,9), für sich jedoch nicht signifikant ( $p=0,1134$ ).

**NHEJ**

Im Gen **XRCC4** zeigte der Marker **rs1382367** mit einer OR~0,4 ein signifikant niedrigeres Risiko für Lungenkrebs ( $p=0,0491$ ) der Homozygoten gegenüber Wildtypträgern. Für Heterozygote konnte kein verändertes Risiko geschätzt werden (OR=1,1 95%-CI: 0,6-1,9;  $p=0,8250$ ). Unter der Annahme eines rezessiven Erbgangs konnte für den Marker ein signifikanter Einfluss beobachtet werden ( $p=0,0277$ ). Für keinen der anderen Marker in diesem Gen konnte ein erhöhtes genotypisches Lungenkrebsrisiko beobachtet werden.

Gleich zwei Marker, **rs601391** und **rs604845**, des Gens **MRE11A** zeigten einen signifikanten Einfluss auf das Lungenkrebsrisiko. Bei beiden Markern wurde für Heterozygote gegenüber Wildtypträgern eine OR von ~1,9 (95%CI: 1,1 - 3,3;  $p=0,0276$  bzw.  $p=0,0285$ ) beobachtet. Für Homozygote gegenüber Wildtypträgern wurden aber keine signifikant veränderten Risiken beobachtet (rs601391; OR=0,9,  $p=0,7822$ ; rs604845: OR=1,0  $p=0,9374$ ). Unter der Annahme eines dominanten Erbgangs verfehlten beide Marker die Signifikanz knapp ( $p_{rs601391}=0,0681$ ,  $p_{rs604845}=0,0575$ ).

Für den Marker **rs3729558** aus dem Gen **PCNA** wurde für Homozygote gegenüber Wildtypträgern eine signifikante OR=2,4 (95%-CI: 1,1-5,3;  $p=0,0313$ ) beobachtet, für Heterozygote gegenüber Wildtypträgern eine OR=1,8 (95%-CI: 0,9 - 3,5), die mit  $p=0,0750$  die Signifikanz knapp verfehlte. Unter der Annahme eines additiven Erbgangs erwies sich der Marker mit  $p=0,0308$  als signifikant mit Lungenkrebs assoziiert.

**MMR**

Für keinen der Marker dieses Reparaturweges konnte ein genotypisches verändertes Lungenkrebsrisiko beobachtet werden.

**Apoptose**

Für den untersuchten Marker dieses Reparaturweges konnte kein genotypisches verändertes Lungenkrebsrisiko beobachtet werden.

Nähere Einzelheiten siehe Tabelle 22.

**Tabelle 22 Signifikante genetische Assoziation mit Lungenkrebs (p<0.05).**

| Gen                                      | Marker  | s.Allel | Effekt      | OR <sup>§</sup> (95%-CI) | p-Wert <sup>§</sup> | p-Wert *<br>BWS-Test |
|--|---|---------|-------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |   |         |             |                          |                     |                      |
| hOGG1                                    | rs125701  | A       | co-dominant |                          | 0,2834              | 0,0452               |
| hOGG1                                    | rs2072668   | G       | dominant    | 1,8 ( 1,0 - 3,1 )        | 0,0389              | ,                    |
|  |   |         | 1 vs 0      | 1,8 ( 1,0 - 3,2 )        | 0,0444              | ,                    |
|  |   |         | co-dominant |                          | 0,1170              | 0,0151               |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |   |         |             |                          |                     |                      |
| LIG4                                     | rs9587525   | G       | co-dominant |                          | 0,3527              | 0,0260               |
| LIG4                                     | rs1805388   | T       | co-dominant |                          | 0,4234              | 0,0325               |
| MRE11A                                   | rs601391  | T       | 1 vs 0      | 1,9 ( 1,1 - 3,3 )        | 0,0276              | ,                    |
|  |   |         | dominant    | 1,6 ( 1,0 - 2,8 )        | 0,0681              | ,                    |
|  |   |         | co-dominant |                          | 0,0599              | 0,3508               |
| MRE11A                                   | rs604845  | A       | 1 vs 0      | 1,9 ( 1,1 - 3,2 )        | 0,0285              | ,                    |
|  |   |         | dominant    | 1,7 ( 1,0 - 2,8 )        | 0,0575              | ,                    |
|  |   |         | co-dominant |                          | 0,0735              | 0,3200               |
| XRCC4                                    | rs1382367   | T       | rezessiv    | 0,4 ( 0,2 - 0,9 )        | 0,0277              | ,                    |
|  |   |         | 2 vs 0      | 0,4 ( 0,2 - 1,0 )        | 0,0491              | ,                    |
| PCNA                                     | rs3729558   | G       | additiv     | 1,5 ( 1,0 - 2,3 )        | 0,0308              | ,                    |
|  |   |         | dominant    | 2,0 ( 1,0 - 3,7 )        | 0,0353              | ,                    |
|  |   |         | 1 vs 0      | 1,8 ( 0,9 - 3,5 )        | 0,0750              | ,                    |
|  |   |         | 2 vs 0      | 2,4 ( 1,1 - 5,3 )        | 0,0313              | ,                    |
| BWS                                      | Baumgartner-Weiss-Schindler-Test: nicht adjustierter, exakter Test (Neuhäuser 2002)         |         |             |                          |                     |                      |
| s.Allel                                  | selteneres Allel  |         |             |                          |                     |                      |
| Effekt:                                  | co-dominant...gesamter Marker in einem co-dominantem Modell                                 |         |             |                          |                     |                      |
| §  | 0...Wildtypträger (kein s.Allel), 1...Heterozygote (1 s.Allel), 2...Homozygote (2 s.Allele) |         |             |                          |                     |                      |
| 95%-CI                                   | adjustiert für Alter, Geschlecht, Rauchen, Voll- und Basisschaden                           |         |             |                          |                     |                      |
|  | 95% Vertrauensbereich   |         |             |                          |                     |                      |

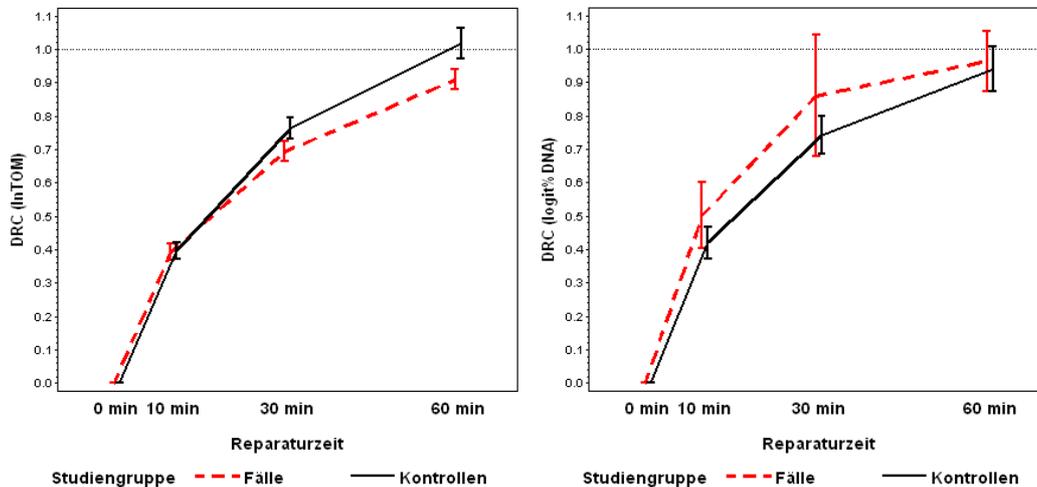
### Einfluss von Alter, Geschlecht und Krankheitsstatus auf die Strahlenempfindlichkeit

Hoch signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen ließen sich für die Zielgröße lnTOM für die DRC nach 30 (p<0.0001) und nach 60 Minuten (p=0.0004) beobachten. Während sich weder der Basis- (p=0,1055) noch der strahleninduzierte Initialschaden (p=0,6664) nach dem Krankheitsstatus zu unterscheiden scheint, haben die Kontrollen - bemessen am lnTOM - nach 30 Minuten ~76% des induzierten Schadens repariert, die Fälle jedoch nur ~67%. Nach 60 Minuten haben die Kontrollen den Schaden vollständig, die Fälle hingegen nur zu 90% repariert. Bemessen am lnTOM zeigen Fälle demnach eine schnellere und effizientere Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden.

Bemessen am logit %DNA, lassen sich diese Beobachtungen jedoch statistisch nicht replizieren (p<sub>30 Minuten</sub>=0,8328, p<sub>60 Minuten</sub>=0,9760). Dies liegt an der deutlich höheren Unsicherheit in der Schätzung eines für alle Kontrollen geltenden Effektes. Für die DRC<sub>30</sub> Minuten wurde eine Standardabweichung s von 1,2 für Fälle, aber nur von 0,36 für Kontrollen beobachtet.

Für lnTOM waren  $s=0,20$  für Fälle und Kontrollen. logit %DNA lässt, wenn auch nicht statistisch signifikant, einen anderen Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen vermuten. Bemessen am logit%DNA zeigen Fälle demnach eine langsamere Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden.

**Abbildung 11: Verlauf der DNA-Reparaturkapazität: Vergleich von Fällen und Kontrollen**



dargestellt sich die alter- und geschlechtsadjustierte Mittelwerte und deren 95%-Konfidenzintervalle

Mittels lnTOM konnten für Basis- und strahleninduzierten Initialschaden und für die DRCs signifikante Geschlechtsunterschiede beobachtet werden. Frauen zeigten gegenüber Männern tendenziell den geringeren Basis- oder strahleninduzierter Initialschaden, aber auch eine geringere Reparaturfähigkeit (kleinere DRC). Diese Geschlechtsunterschiede fallen jedoch zwischen Fällen und Kontrollen ungleich aus. Unter den Fällen zeigte sich kein oder ein deutlich geringerer Geschlechtsunterschied für den Basisschaden ( $p=0,5252$ ) als für die Reparaturfähigkeit 30 Minuten ( $p=0,7300$ ) und 60 Minuten ( $p=0,7836$ ) nach Bestrahlung.

Hingegen zeigten männliche Fälle einen höheren strahleninduzierter Initialschaden als weibliche Fälle ( $p=0,0598$ ), aber 10 Minuten nach der Bestrahlung haben männliche Fälle bereits im Mittel 42% (ebensoviel wie männlich Kontrollen), weibliche Fälle im Mittel nur 34% des Schadens repariert ( $p=0,0060$ ).

Dieser am lnTOM im Großen und Ganzen bei alle Zielgrößen beobachtbare Geschlechtsunterschied konnte, bemessen am logit %DNA, nur für den Basisschaden unter Kontrollen, dem strahleninduzierten Initialschaden und dem hochsignifikanten DRC nach 60 Minuten repliziert werden.

Alterseinflüsse lassen sich in dem zur Verfügung stehenden Kollektiv nur bedingt belegen, da die meisten Studienteilnehmer zwischen 45 und 55 Jahre alt waren, die Alterspanne also sehr gering ist. Dennoch konnten unter Kontrollen ein mit dem Alter signifikant ansteigender Basis- und strahleninduzierter Initialschaden beobachtet werden (sowohl an lnTOM als auch an logit %DNA bemessen). Auffälligerweise wurde unter Fällen kein Beleg für einen solchen Anstieg gefunden. Hingegen zeigten jüngere gegenüber älteren Fällen eine höhere Reparaturfähigkeit, vor allem 10 Minuten nach Bestrahlung.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Höhe des Basis- und des strahleninduzierten Initialschadens unter Kontrollpersonen durch Alter und Geschlecht mitbestimmt wird. Unter den Fällen konnten diese Einflüsse nicht oder nur deutlich abgemildert beobachtet werden. Fälle unterscheiden sich ferner von Kontrollen - zumindest bemessen am lnTOM - in der Repara-

## Fall-Kontroll-Studie

turfähigkeit. 60 Minuten nach Bestrahlung bestand unter LK-Patienten noch ein 10%iger Restschaden, wohingegen unter Kontrollen die Reparatur abgeschlossen war.

Eine Übersicht der Ergebnisse bietet Tabelle 23.

**Tabelle 23: Übersicht Signifikanzen für Alter, Geschlecht und Krankheitsstatus**

|                                      |       | Alter |   |    | Geschlecht |   |    | Krankheitsstatus |
|--------------------------------------|-------|-------|---|----|------------|---|----|------------------|
|                                      |       | F+K   | F | K  | F+K        | F | K  |                  |
| Basisschaden                         | lnTOM | ♣     |   | ♣  | ♣          |   | ♣  |                  |
|                                      | %DNA  |       |   | ♣  |            |   | ♣  |                  |
| strahlungsinduzierter Initialschaden | lnTOM | ♣     |   | ♣  | ♣          | ♣ |    |                  |
|                                      | %DNA  | ♣     |   | ♣♣ |            |   |    |                  |
| Reparatur 10 Min.                    | lnTOM |       | ♣ |    | ♣          | ♣ |    |                  |
|                                      | %DNA  |       | ♣ |    |            |   |    |                  |
| Reparatur 30 Min.                    | lnTOM |       |   |    | ♣          |   | ♣  | ♣♣               |
|                                      | %DNA  | ♣     | ♣ |    |            |   |    |                  |
| Reparatur 60 Min.                    | lnTOM |       |   |    | ♣          |   | ♣♣ | ♣♣               |
|                                      | %DNA  |       | ♣ |    |            |   |    |                  |

F..... Fälle, K...Kontrollen

♣♣.... hoch signifikante Beobachtung:  $p < 0.0005$

♣..... signifikante Beobachtung:  $0.005 \leq p < 0.05$ ,

♣..... auffällige Beobachtungen:  $0.05 \leq p < 0.1$

### *Einfluss genetische Marker auf die Strahlenempfindlichkeit*

Bei 10 der untersuchten Gene zeigt sich bei mindestens einem Marker (insgesamt bei 17 Markern) eine signifikante Assoziation je Schaden (Basis- oder strahleninduzierter Initialschaden oder zur Reparatur nach 30 Minuten) und Zielgröße (lnTOM oder logit %DNA) (siehe Tabelle 24). Es fällt auf, dass nur bei 2 Markern (rs4608577 des Gens MSH2 und rs8179181 des Gens TFGB1) ein beobachteter Effekt sowohl bezüglich lnTOM als auch logit %DNA signifikant war. Für die erzielten p-Werte wurde je Schaden und Zielgröße die FDR (false discovery rate) geschätzt. Im Weiteren werden nur die Ergebnisse der Marker mit einer  $FDR < 0.5$  erläutert (siehe Tabelle 23).

Tabelle 24: Signifikante genetische Marker (p<0,05): co-dominantes Modell

| Gen                                      | Marker | rs_Nr.r    | Studien-<br>gruppe | Reparatur 30 min |           | strahlungsinduzierter<br>Initialschaden |          | Basisschaden  |           | basierend<br>auf...<br>Beobachtungen |
|--|--------|------------|--------------------|------------------|-----------|---|----------|---------------|-----------|--------------------------------------|
|  |        |            |                    | logit<br>%DNA    | InTOM     | logit<br>%DNA                           | InTOM    | logit<br>%DNA | InTOM     |                                      |
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |        |            |                    |                  |           |   |          |               |           |                                      |
| hOGG1                                    | 2      | rs2072668  | Kontrollen         | * 0,0404         | 0,1975    | 0,1074                                  | 0,4464   | 0,4957        | 0,7718    | 151 von 169                          |
| XRCC1                                    | 4      | rs3213334  | beide              | 0,8476           | 0,2292    | * 0,0480                                | 0,1378   | 0,2903        | ** 0,0047 | 277 von 346                          |
|  |        |            | Kontrollen         | 0,8282           | 0,0921    | 0,0722                                  | 0,1605   | 0,2003        | * 0,0279  | 134 von 169                          |
| PARP1                                    | 2      | rs3219110  | beide              | 0,4622           | 0,7081    | * 0,0374                                | 0,0612   | 0,3192        | 0,1233    | 315 von 346                          |
|  | 3      | rs3754376  | Fälle              | 0,1414           | * 0,0245  | 0,6578                                  | 0,9900   | * 0,0370      | 0,5896    | 152 von 177                          |
|  | 4      | rs7542788  | Kontrollen         | 0,8676           | 0,5521    | * 0,0130                                | 0,3400   | 0,8584        | 0,4670    | 157 von 169                          |
|  |        |            | beide              | 0,4714           | 0,4922    | * 0,0252                                | 0,3901   | 0,3176        | 0,4489    | 318 von 346                          |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |        |            |                    |                  |           |   |          |               |           |                                      |
| LIG4                                     | 2      | rs1151403  | Kontrollen         | 0,5807           | 0,9014    | ** 0,0064                               | 0,0519   | 0,6675        | 0,5841    | 152 von 169                          |
|  | 4      | rs1805388  | Fälle              | 0,2695           | * 0,0308  | 0,7152                                  | 0,7797   | 0,6270        | 0,7082    | 163 von 177                          |
| MRE11A                                   | 7      | rs13447623 | Kontrollen         | * 0,0100         | 0,6456    | 0,7439                                  | 0,5511   | 0,9905        | 0,2397    | 156 von 169                          |
|  |        |            | beide              | 0,5939           | 0,9227    | 0,9550                                  | 0,8390   | 0,3745        | * 0,0427  | 319 von 346                          |
|  | 9      | rs659349   | Fälle              | 0,6403           | 0,6918    | 0,1760                                  | 0,0957   | 0,6809        | * 0,0282  | 159 von 177                          |
|  |        |            | beide              | 0,7086           | 0,5977    | 0,1798                                  | 0,3980   | 0,2679        | * 0,0436  | 315 von 346                          |
| RAD50                                    | 2      | rs2237060  | beide              | 0,1592           | 0,2730    | 0,8897                                  | 0,8879   | 0,7604        | ** 0,0064 | 313 von 346                          |
|  |        |            | Kontrollen         | 0,6147           | ** 0,0084 | 0,7993                                  | 0,6565   | 0,3745        | 0,1508    | 152 von 169                          |
|  |        |            | Fälle              | 0,2334           | 0,8485    | 0,7981                                  | 0,9818   | 0,1011        | * 0,0258  | 161 von 177                          |
| XRCC4                                    | 5      | rs1193693  | beide              | 0,4443           | ** 0,0080 | 0,8285                                  | 0,4350   | 0,2543        | 0,1402    | 31 von 346                           |
| ATM                                      | 4      | rs611646   | Fälle              | 0,4900           | 0,0546    | 0,9215                                  | 0,7647   | 0,1342        | * 0,0308  | 159 von 177                          |
| <b>Miss Match Repair (MMR)</b>           |        |            |                    |                  |           |   |          |               |           |                                      |
| MSH2                                     | 2      | rs1981929  | Kontrollen         | 0,1925           | * 0,0233  | 0,4035                                  | 0,7398   | 0,1192        | 0,2317    | 157 von 169                          |
|  | 3      | rs3732183  | Fälle              | 0,2839           | 0,2543    | 0,7946                                  | 0,2977   | 0,4842        | * 0,0282  | 128 von 177                          |
|  |        |            | Kontrollen         | 0,0893           | * 0,0423  | 0,6621                                  | 0,3156   | 0,7199        | 0,3858    | 134 von 169                          |
|  | 4      | rs4608577  | Kontrollen         | 0,4465           | ** 0,0063 | 0,2282                                  | 0,2592   | 0,0682        | 0,0924    | 157 von 169                          |
|  |        |            | beide              | 0,9697           | 0,0767    | 0,8418                                  | 0,6795   | * 0,0330      | * 0,0130  | 317 von 346                          |
| <b>Apoptose</b>                          |        |            |                    |                  |           |   |          |               |           |                                      |
| TGFB1                                    | 1      | rs8179181  | Kontrollen         | 0,9233           | 0,6420    | * 0,0221                                | * 0,0130 | 0,8909        | 0,7156    | 120 von 169                          |
| (B9D2)                                   | 2      | rs2317130  | beide              | ** 0,0060        | 0,8671    | 0,7066                                  | 0,9743   | 0,7153        | 0,6697    | 296 von 346                          |
|  |        |            | Fälle              | * 0,0290         | 0,9524    | 0,0586                                  | 0,0579   | 0,6677        | 0,8870    | 147 von 177                          |

p-Werte <0,05 grau unterlegt; \*...p<0,05; \*\*...p<0,01

Tabelle 25 FDR für genetische Marker (p<0,05): co-dominantes Modell

| Schaden                                     | Gen*              | Marker | FDR (false discovery rate) |                |                | p-Wert               |           |            |  |
|---|-------------------|--------|----------------------------|----------------|----------------|----------------------|-----------|------------|--|
|   |                   |        | Fälle und Kontrollen       | Fälle          | Kontrollen     | Fälle und Kontrollen | Fälle     | Kontrollen |  |
| <b>Basisschaden</b>                         |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| <b>lnTOM</b>                                |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| Basisschaden                                | XRCC1             | 4      | 0,64528                    |                | 0,65244        | ** 0,0047            | 0,0945    | * 0,0279   |  |
|   | RAD50             | 2      | 0,64528                    | 0,65244        |                | ** 0,0064            | * 0,0258  | --         |  |
|   | MSH2              | 4      | 0,65244                    |                |                | * 0,0130             | 0,0645    | --         |  |
|   | MRE11A            | 9      | 0,65244                    | 0,65244        |                | * 0,0436             | * 0,0282  | --         |  |
|   | MSH2              | 3      |                            | 0,65244        |                | 0,0560               | * 0,0282  | --         |  |
|   | ATM               | 4      |                            | 0,65244        |                | --                   | * 0,0308  | --         |  |
|   | MRE11A            | 7      | 0,65244                    |                |                | * 0,0427             | --        | --         |  |
| <b>logit %DNA</b>                           |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
|   | MSH2              | 4      | 0,94612                    |                |                | * 0,0330             | --        | --         |  |
|   | PARP1             | 3      |                            | 0,94612        |                | --                   | * 0,0370  | --         |  |
| <b>strahlungsinduzierter Initialschaden</b> |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| <b>lnTOM</b>                                |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| strahlungsinduzierter Initialschaden        | TGFB1             | 1      |                            |                | 0,99729        | --                   | --        | * 0,0130   |  |
|   | <b>logit %DNA</b> |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
|   | LIG4              | 2      |                            |                | 0,99574        | --                   | --        | ** 0,0064  |  |
|   | PARP1             | 4      | 0,99574                    |                | 0,99574        | * 0,0252             | --        | * 0,0130   |  |
|   | TGFB1             | 1      |                            |                | 0,99574        | --                   | --        | * 0,0221   |  |
|   | PARP1             | 2      | 0,99574                    |                |                | * 0,0374             | --        | --         |  |
|   | XRCC1             | 4      | 0,99574                    |                |                | * 0,0480             | --        | --         |  |
| <b>Reparatur nach 30 min</b>                |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| <b>lnTOM</b>                                |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
| Reparatur nach 30 min                       | MSH2              | 4      |                            |                | <b>0,41798</b> | 0,0767               | --        | ** 0,0063  |  |
|   | XRCC4             | 5      |                            | <b>0,41798</b> |                | --                   | ** 0,0080 | --         |  |
|   | RAD50             | 2      |                            |                | <b>0,41798</b> | --                   | --        | ** 0,0084  |  |
|   | MSH2              | 2      |                            |                | 0,69772        | --                   | --        | * 0,0233   |  |
|   | PARP1             | 3      |                            | 0,69772        |                | --                   | * 0,0245  | --         |  |
|   | LIG4              | 4      |                            | 0,76796        |                | --                   | * 0,0308  | --         |  |
|   | MSH2              | 3      |                            |                | 0,84179        | --                   | --        | * 0,0423   |  |
| <b>Logit %DNA</b>                           |                   |        |                            |                |                |                      |           |            |  |
|   | BRCA2             | 1      | <b>0,49973</b>             | <b>0,49973</b> |                | ** 0,0029            | ** 0,0088 | --         |  |
|   | TGFB1 (B9D2)      | 2      | <b>0,49973</b>             | 0,99994        |                | ** 0,0060            | * 0,0290  | --         |  |
|   | MRE11A            | 7      |                            |                | <b>0,49973</b> | --                   | --        | * 0,0100   |  |
|   | hOGG1             | 2      |                            |                | 0,99994        | --                   | --        | * 0,0404   |  |

\* aufsteigende nach dem kleinsten p-Wert sortiert

Nur p-Werte <0,1 werden in der Tabelle angezeigt, FDR (false discovery rate) wurde je Zielgröße und je Studiengruppe bestimmt, FDR <0,5 fett hervorgehoben; p-Werte <0,05 grau unterlegt

**BER**

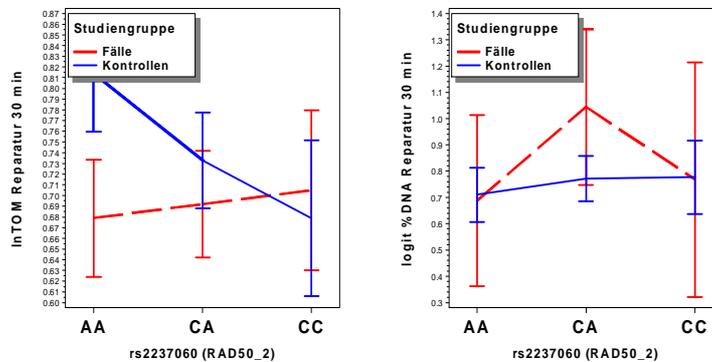
Kein Marker dieses Reparaturweges zeigte sich als signifikant assoziiert.

**NHEJ**

Der Marker **rs2237060 im Gen RAD50** zeigte einen signifikanten Einfluss auf die **Reparatur nach 30 Minuten** bemessen am InTOM in den Kontrollen.

Kontrollen mit dem Genotyp AA am Marker rs2237060 (RAD50) haben 30 Minuten nach der Bestrahlung, bemessen am InTOM, bereits 81% (95%-CI: 76%-87%) des induzierten Schadens repariert, jene mit dem Genotyp CA 73% (95%-CI: 69%-78%) und jene mit dem Genotyp CC nur 68% (95%-CI: 61%-75%). Das Allel C hemmt somit signifikant ( $p=0,0084$ ) die DNA-Reparatur unter Kontrollen. Unter Fällen ( $p=0,8485$ ) als auch bemessen am logit %DNA ( $p_{\text{Fälle}}=0,2334$ ,  $p_{\text{Kontrollen}}=0,6148$ ) kann dieser Effekt nicht beobachtet werden.

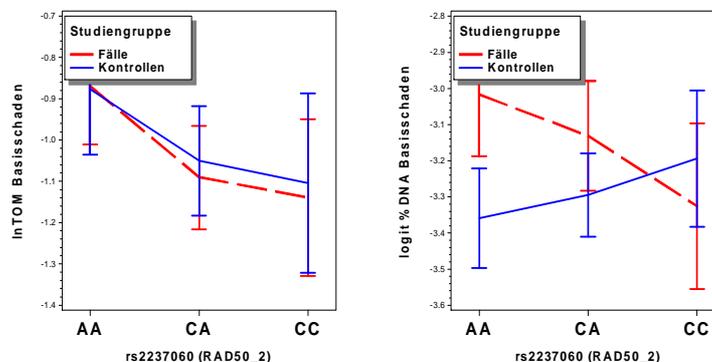
**Abbildung 12: Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs2237060 (RAD50)**



Allelhäufigkeit des selteneren Allels C: 38%

Mit  $p=0,0065$  konnte für denselben Marker zusätzlich ein, bemessen am InTOM, signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen variierender Basisschaden beobachtet werden. Träger des Genotyps AA zeigten mit  $\text{InTOM}=-0,88$  (95%-CI: -0,98- -0,77) einen höheren Schaden ohne Bestrahlung als die Träger der anderen Genotypen ( $\text{InTOM}_{\text{CA}}=-1,08$  95%-CI=-1,17- -0,99;  $\text{InTOM}_{\text{CC}}=-1,12$  95%-CI=-1,26- -0,97). Dies gilt für Fälle wie für Kontrollen gleichermaßen und kann in ähnlicher Weise, wenn auch nicht signifikant, für Fälle bemessen am logit %DNA beobachtet werden ( $p=0,1011$ ).

**Abbildung 13: Genotypischer Basisschaden: rs2237060 (RAD50)**

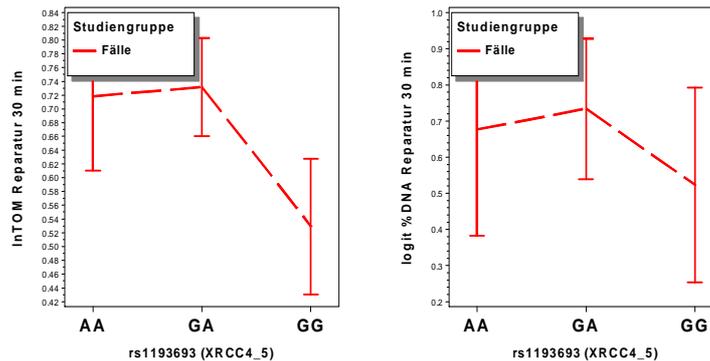


Allelhäufigkeit des selteneren Allels C: 38%

Für den Marker **rs1193693 im Gen XRCC4** zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die **Reparatur nach 30 Minuten**, bemessen am lnTOM, in der kleinen Gruppe von 31 Fällen (nur von diesen stehen Genotypen zur Analyse zur Verfügung).

Fälle mit dem Genotyp GG (n=8 von 31) haben 30 Minuten nach der Bestrahlung, bemessen am lnTOM, nur 53% (95%-CI: 43%-63%) des induzierten Schadens repariert, jene mit dem Genotyp GA 73% (95%-CI: 66%-80%) und jene mit dem Genotyp AA nur 72% (95%-CI: 61%-83%). Bemessen am logit %DNA können ähnliche, sich aber nicht signifikant unterscheidende Werte beobachtet werden (p=0,4443).

**Abbildung 14: Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs1193693 (XRCC4)**

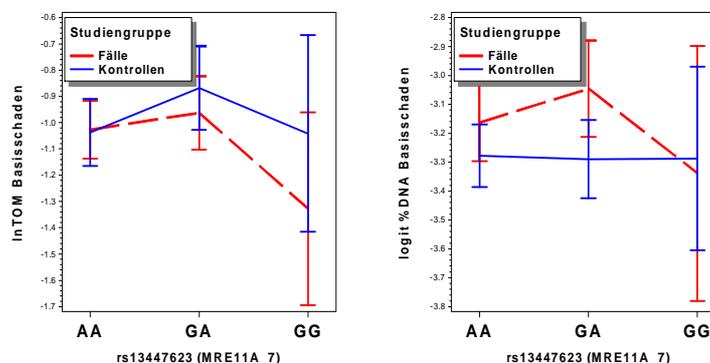


Allelhäufigkeit des selteneren Allels G: 48%

Für die Marker **rs13447623 und rs659349 im Gen MRE11A** zeigte sich jeweils ein signifikanter Einfluss auf den **Basisschaden**, bemessen am lnTOM, in den Kontrollen.

Träger des Genotyps GG am Marker **rs13447623** zeigten mit lnTOM=-1,19 (95%CI: -1,46- -0,93) einen geringeren Basisschaden (p=0,0428), als die Träger des Genotyps GA (lnTOM=-0,90 95%-CI: -1,01- -0,80) oder des Genotyps AA (lnTOM=-1,04 95%-CI: -1,13- -0,96). Ein ähnliches, wenn auch nicht signifikantes Bild (p=0,3410), konnte bemessen am logit %DNA für Kontrollen beobachtet werden. Vergleichbares konnte auch für den Marker rs659349 beobachtet werden, wobei Träger des Genotyps CC einen höheren Basisschaden aufwiesen.

**Abbildung 15: Genotypischer Basisschaden: rs13447623 (MRE11A)**

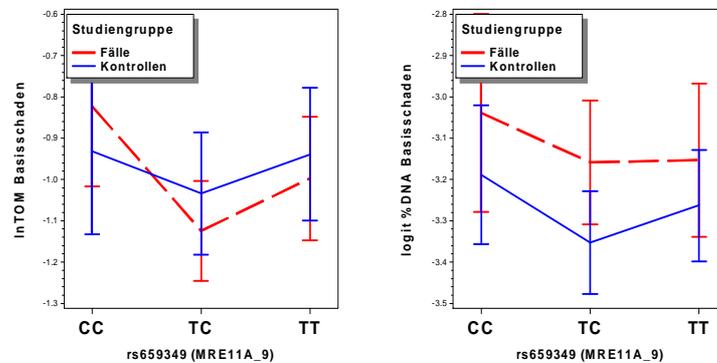


Allelhäufigkeit des selteneren Allels G: 33%

Unter den Fällen zeigten Träger des Genotyps CC am Marker **rs659349** mit lnTOM=-0,82 (95%CI: -1,02- -0,63) einen geringeren Basisschaden (p=0,0282), als die Träger des Genotyps TC (lnTOM=-1,12 95%-CI: -1,25- -1,00) oder des Genotyps TT (lnTOM=-1,00 95%-CI:

-1,15 -0,85). Unter den Kontrollen konnte kein solcher Effekt beobachtet werden ( $p=0,5976$ ). Ein ähnliches, wenn auch nicht signifikantes Bild ( $p=0,2680$ ), konnte bemessen am logit %DNA für Fälle wie für Kontrollen beobachtet werden.

Abbildung 16: Genotypischer Basisschaden: rs659349 (MRE11A)



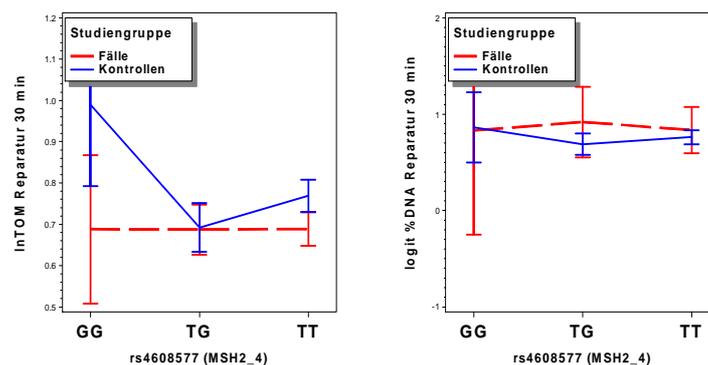
Allelhäufigkeit des selteneren Allels C: 35%

### MMR

Der Marker **rs4608577 im Gen MSH2** zeigte einen signifikanten Einfluss auf die **Reparatur nach 30 Minuten**, bemessen am lnTOM, in den Kontrollen.

Träger des selteneren homozygoten Genotyps GG ( $n=4$  von 166) von **rs4608577 (MSH2)** wiesen mit  $\ln\text{TOM}=0,99$  ( $95\% \text{CI}=0,79-1,19$ ) einen deutlich höheren Anteil reparierten Schadens auf, als Träger der anderen Genotypen ( $\text{DRC}_{\text{AA}}=0,69$   $95\% \text{-CI}=0,63-0,75$ ;  $\text{DRC}_{\text{AG}}=0,77$   $95\% \text{CI}=0,73-0,81$ ). Unter den Fällen konnte kein derartiger genetischer Effekt beobachtet werden, der mittlere Anteil reparierten Schadens lag bei allen Genotypen bei 0,69. Mit  $p=0,4465$  konnte dieser Effekt, bemessen am logit %DNA, jedoch nicht beobachtet werden.

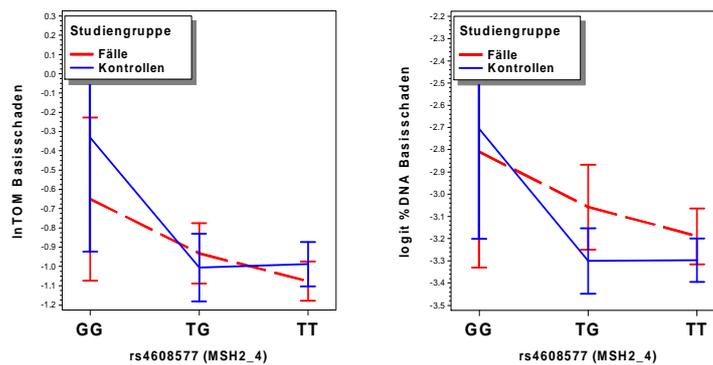
Abbildung 17: Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs4608577 (MSH2)



Allelhäufigkeit des selteneren Allels G: 23%

Mit  $p=0,0131$  konnte für denselben Marker zusätzlich ein, bemessen am lnTOM, signifikanter, zwischen den Genotypen variierender Basisschaden beobachtet werden. Träger des Genotyps GG zeigten mit  $\ln\text{TOM}=-0,50$  ( $95\% \text{-CI}=-0,85- -0,41$ ) einen rund doppelt so hohen Schaden ohne Bestrahlung als die Träger der anderen Genotypen ( $\ln\text{TOM}_{\text{TG}}=-0,98$   $95\% \text{-CI}=-1,10- -0,86$ ;  $\ln\text{TOM}_{\text{TT}}=-1,04$   $95\% \text{-CI}=-0,11- -0,96$ ). Dies gilt für Fälle wie für Kontrollen gleichermaßen und kann mit  $p=0,0331$  auch bemessen am logit %DNA beobachtet werden.

Abbildung 18: Genotypischer Basisschaden: rs4608577 (MSH2)



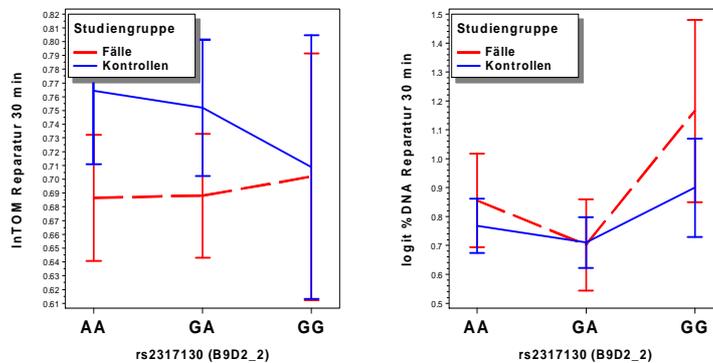
Allelhäufigkeit des selteneren Allels G: 23%

*Apoptose*

Für den Marker rs2317130 im Gen B9D2 (tagging SNP für TGFB1) zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die **Reparatur nach 30 Minuten**, bemessen am logit %DNA.

Fälle und Kontrollen mit dem Genotyp GG haben 30 Minuten nach der Bestrahlung, bemessen am logit %DNA, bereits den induzierten Schaden vollständig repariert (95%-CI: 85%-126%), jene mit dem Genotyp GA zu 71% (95%-CI: 62%-80%) und jene mit dem Genotyp AA zu 81% (95%-CI: 72%-91%). Mit  $p=0,8672$  konnte dies, bemessen am InTOM, nicht beobachtet werden.

Abbildung 19: Genotypische DNA-Reparaturkapazität: rs2317130 (TGFB1)



Allelhäufigkeit des selteneren Allels C: 31%

### III.5 Familienstudie

#### III.5.1. Methoden

##### Heritabilität

---

Die Schätzung der Heritabilität wurde für den Basisschaden (Messungen ohne Bestrahlung), den strahlungsinduzierter Initialschaden (Messungen direkt nach der Bestrahlung) und die DRCs (DNA-Reparatur-Kapazitäten: 10, 30 bzw. 60 Minuten nach der Bestrahlung) untersucht. Als Zielgrößen wurden die für den COMET-Assay empfohlenen Endpunkte (Lovell and Omori, 2008) InTOM und der logit %DNA verwendet.

Die (nominale) Heritabilität  $h_{\text{nominal}}^2$  wurde aus „parent-offspring Regression“-Modellen geschätzt (Khoury 1993, Falconer und Mackay 1996, Fernandez und Miller 1985). Dabei wird der mittlere Messwert aller Nachkommen durch die mittleren Messwerte der Eltern im Sinne einer linearen Regression erklärt. Ist der Messwert von nur einem Elternteil verfügbar („one parent-offspring Regression“), so ergibt sich die Heritabilität als  $\hat{h}_{1-p}^2 = 2\beta$ , mit dem Regressionskoeffizienten  $\beta$  (= Steigung der Ausgleichsgerade). Sind die Messwerte beider Elternteile verfügbar („mid-parent-offspring Regression“), so ergibt sich die Heritabilität als  $\hat{h}_{\text{mid-p}}^2 = \beta$ . Die Schätzwerte wurden für das mittlere Alter und das mittlere Geschlecht der Nachkommen, als auch am entsprechenden Messwert der humanen Referenz des jeweiligen Versuchs adjustiert. Die beiden Schätzwerte wurden anschließend im Sinne einer Meta-Analyse zusammengefasst. Die geschätzte Heritabilität ergibt sich schließlich als gewichtetes Mittel:  $\hat{h}^2 = w_{1-p} \hat{h}_{1-p}^2 + w_{\text{mid-p}} \hat{h}_{\text{mid-p}}^2$ , wobei die Gewichte  $w_{1-p} = (se_{\hat{\beta}_{1-p}}^2)^{-1}$  und  $w_{\text{mid-p}} = (se_{\hat{\beta}_{\text{mid-p}}}^2)^{-1}$  sind (se Standardfehler der geschätzten  $\beta$ ). Der Standardfehler der Heritabilität ergibt sich als:  $se_{\hat{h}^2} = (w_{1-p} + w_{\text{mid-p}})^{-1}$  (Petitti, 2000). Zur Schätzung der Heritabilität wurden alle verfügbaren 2- und 3-Generationen-Familien der Familienstudie verwendet.

Der COMET-Assay ist ein Experiment mit mannigfaltigen, schwer kontrollierbaren, in ihrer Auswirkung unbekanntem Störeinflüssen, z. B. exakte experimentelle Strahlungs-dosis, Umweltstrahlung, exakte Reparaturzeit. Der Einfluss des experimentellen Designs auf die Schätzwerte der Heritabilität, wurden aus den KORA-Kontrollen der Fall-Kontroll-Studie ermittelt. Die KORA-Kontrollen innerhalb eines Versuchs wurden zufällig in „Pseudo-Familien“ gruppiert, wobei die Zuordnung „Elternteil“ oder „Kind“ ebenfalls zufällig erfolgte. Die Schätzung der Heritabilität erfolgte wie oben beschrieben. Dieses Prozedere wurde 3000-mal wiederholt. Das Mittel, der solchermaßen geschätzten Heritabilität wurde als design-induzierte Fehler (=Verzerrung) der Heritabilitätsschätzung  $h_F^2$  aufgefasst. Es wird angenommen, dass sich der Wertebereich der nominalen Heritabilität von  $h_F^2 - 1$  erstreckt (anstelle des theoretischen Bereichs von 0-1). Die aus den Versuchen geschätzten Werte der (nominalen) Heritabilität  $\hat{h}^2$  wurden daher wie folgt korrigiert:  $\hat{h}^2 = \frac{\hat{h}_{\text{nominal}}^2 - \hat{h}_F^2}{1 - \hat{h}_F^2}$ .

### Einfluss von Alter, Geschlecht auf die Strahlenempfindlichkeit

---

Der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Zielgrößen wurde mittels semi parametrischen Modellen geprüft. Für Alter wurde dabei eine Splinefunktion mit 2 Freiheitsgraden an die Daten angepasst, für Geschlecht wurde ein parametrischer Effekt geschätzt. Die Modellschätzungen erfolgten adjustiert für pack years (Splinefunktion mit 2 Freiheitsgraden). Um störende Einflüsse durch die Lungenkrebs Erkrankung der Indexpatienten zu vermeiden, wurde das Kollektiv für diese Untersuchung aus Eltern, Partner und Kinder beschränkt.

### Genetische Assoziation zu Lungenkrebs

---

Die Assoziation genomischer Marker mit Lungenkrebs wurde in der Familienstudie mittels ReConstruction–Transmission Disequilibrium Test (RC-TDT, Knapp 1999) geprüft. Der RC-TDT testet Kopplungsungleichgewicht zwischen einem beobachteten Marker und einer in die Krankheitsentstehung involvierten DNA-Variante. Mit diesem Test werden Verzerrungen durch fehlende elterliche Genotypen korrigiert. Der RC-TDT ist daher ein valider Test, robust gegen Populationsstratifikation.

### Genetische Marker hinsichtlich Strahlenempfindlichkeit

---

Die kontinuierlichen Zielgrößen wurde mittels FBAT (Family-Based-Assoziation-Test) auf Assoziation zu Strahlenempfindlichkeit getestet. FBAT ist eine valide Verallgemeinerung des TDT (transmission-disquilibrium-test) Test auf Kopplung/Kopplungsungleichgewicht für kontinuierliche Messgrößen, anwendbar sowohl für Kernfamilien mit gesunden und erkrankten Geschwistern, aber auch für komplexe Mehrgenerationsfamilien und robust gegen Populationsstratifikation (Bickeboller und Fischer, 2007).

Die allgemeine Teststatistik  $FBAT = U^2 / Var(U)$  basiert dabei auf einer um den Erwartungswert zentrierten Linerkombination  $U$  der Genotypen und Messgrößen der Kinder aus Kernfamilien:  $U = S - E[S]$  mit  $S = \sum_{ij} T_{ij} X_{ij}$ , wobei  $X_{ij}$  eine Funktion der Genotypes des  $j$ -ten Kinds in der  $i$ -ten Familie ist. Mit  $T_{ij}$  wird der zentrierte Phänotyp:  $T_{ij} = Y_{ij} - \mu_{ij}$  bezeichnet (Laired et al., 2000). Der Wert von  $\mu_{ij}$  wurde nach Lunetta et al. (2000) unter Berücksichtigung aller nicht erkrankten Kinder so gewählt, das die  $Var(U)$  minimiert wird (Option -o). Für weiteren Programmparameter wurden die voreingestellten Werte verwendet (minsize 10; min\_freq 0.000; p 1.000; maxcmh 1000).

Die Assoziation je genomischen Marker wurde für additive, dominante und rezessive Modelle getestet. Mit der Software FBAT V2.0 2c (<http://www.biostat.harvard.edu/~fbat>) kann nur auf Assoziation getestet werden, Effektschätzungen werden nicht ausgegeben.

### **III.5.2. Beschreibung der Studienpopulation**

Das Studienkollektiv der Familienstudie bestand aus 99 männlichen und 74 weiblichen LK-Patienten (gesamt 175 Indexpatienten, bei zweien bestanden widersprüchliche Angaben zum Geschlecht) in einem mittlerem Alter von 44,2 Jahren und 623 Familienangehörigen. Als Familienangehörige standen 180 Eltern (aus 123 Familien), 276 Geschwister (aus 152 Famili-

en), 63 Partner und 104 erwachsene Kinder (aus 80 Familien) zur Verfügung. Das für die Auswertung geeignete Studienkollektiv bestand aus 9 (5%) 1-Generationen-, 133 (75%) 2-Generationen- und 35 (20%) 3-Generationenfamilien<sup>▼</sup>. 71 Familien (40%) hatten Priorität I oder II (beide Eltern des LK-Patienten waren verfügbar), 54 Familien (31%) hatten Priorität III oder IV (ein Elternteil des LK-Patienten waren verfügbar), 51 Familien (29%) hatten Priorität V oder X (kein Elternteil des LK-Patienten waren verfügbar)<sup>\*</sup>.

Nur 11% der Indexpatienten gaben an, noch nie eine Zigarette geraucht zu haben. Unter deren Geschwistern und Partnern waren dies hingegen 27%, unter deren Eltern und Kindern 47% bzw. 43%.

Das mittlere Alter bei Rauchbeginn lag allgemein bei ~17 Jahre, unter den Eltern bei ~22 Jahren, unter den Kindern bei ~16 Jahren. 72% der Indexpatienten, aber nur 43% der Geschwister und Partner, waren Raucher. Die mittlere, lebenslang konsumierte Tabakmenge war unter den Indexpatienten mit ~21 Packyears etwa 1,75-mal so hoch wie die, der Geschwister und Partner mit ~12 Packyears (siehe Tabelle 28).

**Tabelle 26 Familientyp (Priorität) der in der Studie analysierten Familien**

| Familientyp (Priorität)               | Generationen |     |    | gesamt |
|---------------------------------------|--------------|-----|----|--------|
|                                       | 1            | 2   | 3  |        |
| <i>P: I) PPI+andere</i>               | --           | 27  | 18 | 45     |
| <i>P: II) PPI (kein anderen)</i>      | --           | 26  | -- | 26     |
| <i>P: III) PI+SK (3 Generationen)</i> | --           | 1   | 17 | 18     |
| <i>P: IV) PI+S (2 Generationen)</i>   | 1            | 35  | -- | 36     |
| <i>P: V) IS+andere</i>                | 7            | 44  | -- | 51     |
| <i>P: X) Einzelperson ist I</i>       | 1            | --  | -- | 1      |
| <b>gesamt</b>                         | 9            | 133 | 35 | 177    |

### Beschreibung der Strahlenempfindlichkeit in der der Studienpopulation

Der Basisschaden bemessen am lnTOM betrug rund -0.9 (Median), der strahleninduzierte Initialschaden 1,6. Bemessen am logit %DNA betrug der Basisschaden -3,0 (also waren ~5% DNA im Tail), der Initialschaden -1,2 (also waren ~23% DNA im Tail).

Wie aus Abbildung 20 und Tabelle 29 zu erkennen, wurde nach 60 Minuten der strahleninduzierte Schaden vollständig repariert. Bemessen am lnTOM hatten die Hälfte der Studienteilnehmer (mediane Werte) nach 10 Minuten ~40%, nach 30 Minuten ~70% und nach 60 Minuten ~90% des Schadens repariert. Bemessen am logit %DNA waren es entsprechend 40%,

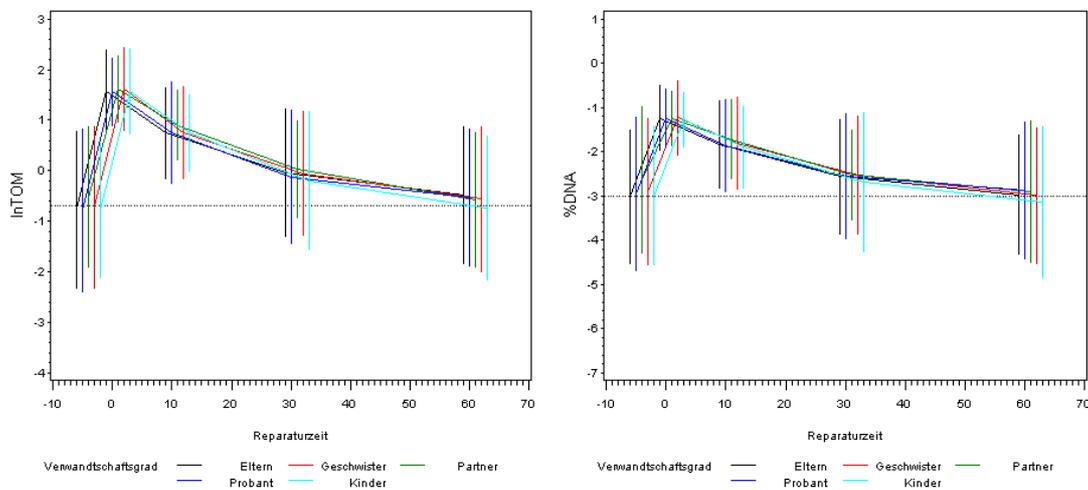
<sup>▼</sup> Da für die Auswertung in der Familienstudie eine Vielzahl von Informationen notwendig ist (valide Fragebogenerhebung, Genotypen, Messungen der Strahlenempfindlichkeit, ect.), sind diese Familien nicht mit jenen vollständig identisch, für die im Rahmen des FE-Vorhabens LCLs angelegt wurden (siehe Bioprobenbank LCL).

<sup>\*</sup> Bei der Familie der Priorität X (Einzelperson) blieben auf Grund mangelnder Auswert- bzw. Verwertbarkeit die Messwerte der Familiengehörigen unberücksichtigt.

70% und 100%. Einen Unterschied zwischen den Verwandtschaftsgruppen (Eltern, Geschwister, Partner, Probanden und Kinder) lies sich nicht erkennen.

Es zeigte sich ferner ein Anstieg der Varianz der Messwerte mit der Reparaturzeit von  $s^2_{\text{Initialschaden}}=0,39^2 / 0,37^2$  zu  $s^2_{\text{Initialschaden}}=0,70^2 / 0,77^2$  (lnTOM / logit %DNA), also auf das 3 bis 4-fache. Die Varianz des Basisschadens ist mit  $s^2=0,77 / 0,82^2$  nahezu gleich der nach 60 Minuten Reparatur. Werden die Messwerte zu DRCs (DNA-Reparaturkapazitäten) verrechnet, stieg die Varianz der Zielgrößen noch klarer an. Für alle Familienmitglieder gesamt betrug die Varianz bemessen am lnTOM der  $\text{DRC}_{10 \text{ Minuten}}$   $0,54^2$  bzw.  $\text{DRC}_{60 \text{ Minuten}}$   $1,42^2$ , war also um das 7-fache höher. Bemessen am logit %DNA betrug die Varianz der  $\text{DRC}_{10 \text{ Minuten}}$   $5,58^2$  bzw.  $\text{DRC}_{60 \text{ Minuten}}$   $11,69^2$ , war also um das 4-fache höher. Einen Unterschied zwischen den Verwandtschaftsgruppen (Eltern, Geschwister, Partner, Probanden und Kinder) lies sich auch für die Varianz der Messgrößen nicht erkennen.

**Abbildung 20: Verlauf der DNA-Schadens: Vergleich der Verwandtschaftsgruppen**



dargestellt sich die Mittelwerte +/- Standardabweichung je Verwandtschaftsgruppe

### Einfluss von Alter, Geschlecht auf die Strahlenempfindlichkeit

---

Lediglich für den Basisschaden, sowie die Reparatur nach 10 und 60 Minuten, bessen am lnTOM, konnte ein signifikanter Einfluß des Alters beobachtet werden (siehe Tabelle 27). Bemessen am logit %DNA zeigt der Basisschaden ein knapp nicht-signifikanten Einfluss. Werde für das Geschlecht noch für pack years konnte ein Einfluß signifikant beobachtet werden.

Sowohl für lnTOM als auch logit %DNA kann kein über das Alter stetig steigender Einfluss auf den Basisschaden beobachtet werden. Vielmehr steigt der Basisschaden bis in alter von ~50 Jahren an (die umfasst im Wesentlichen die Beobachtungen der Kinder und Partner), fällt dann aber wieder ab (dies umfasst die Beobachtungen der Eltern) (siehe Abbildung 21). Ein ähnliche Bild ergibt sich für den strahleninduzierten, auch wenn hier weder für lnTOM noch für logit %DNA Signifikanz erzielt werden konnte. Initialschaden Inwiefern diese Beobachtung durch die Verwandtschaftsbeziehung zur an Lungenkrebs erkrankten Indexperson entsteht, kann aus den Daten nicht erklärt werden.

Tabelle 27: Übersicht signifikanz für den Einfluss von Alter, Geschlecht und pack years auf die Strahlenempfindlichkeit

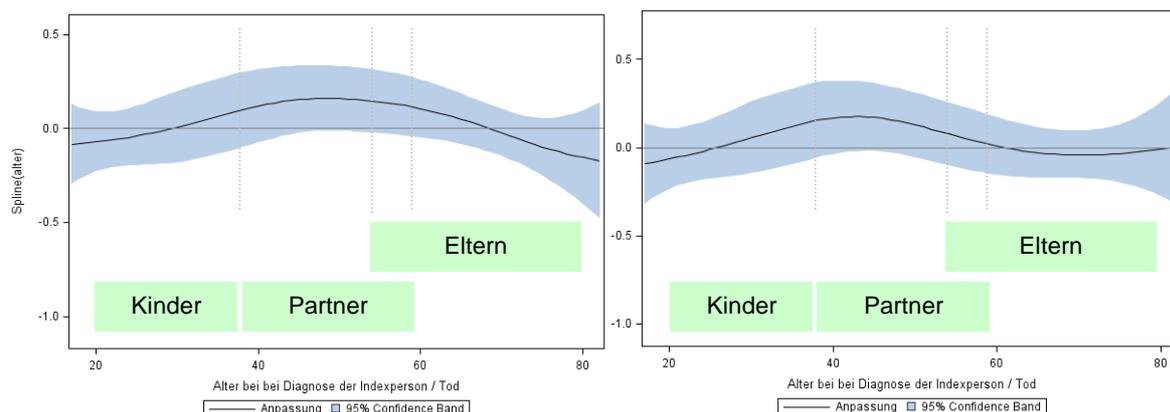
|           |                  | p-Werte        |                     |            |
|-----------|------------------|----------------|---------------------|------------|
|           |                  | Alter (Spline) | Pack years (Spline) | Geschlecht |
| InTOM     | Basisschaden     | * 0.0439       | 0.1983              | 0.4026     |
|           | Initialschaden   | 0.2241         | 0.3073              | 0.6550     |
|           | Reparatur 10 min | * 0.0286       | 0.2445              | 0.5157     |
|           | Reparatur 30 min | 0.1227         | 0.1612              | 0.4401     |
|           | Reparatur 60 min | * 0.0179       | 0.0887              | 0.5683     |
| Logit%DNA | Basisschaden     | 0.0745         | 0.3509              | 0.3140     |
|           | Initialschaden   | 0.1972         | 0.3199              | 0.3299     |
|           | Reparatur 10 min | 0.2818         | 0.0816              | 0.2333     |
|           | Reparatur 30 min | 0.3444         | 0.1185              | 0.4669     |
|           | Reparatur 60 min | 0.4298         | 0.1019              | 0.3897     |

Abbildung 21: Spline-Effekt des Alters auf den Basisschaden

bemessen am:

InTOM

logit %DNA



# Familienstudie

Tabelle 28 Beschreibung der Studienteilnehmer: Alter, Geschlecht und Rauchverhalten

|                                   |  | Eltern (n=180) |               |          | Geschwister (n=276) |               |          | Partner (n=63) |               |          | Proband (n=175) |               |          | Kinder (n=104) |               |          |
|-----------------------------------|--|----------------|---------------|----------|---------------------|---------------|----------|----------------|---------------|----------|-----------------|---------------|----------|----------------|---------------|----------|
|                                   |  | N              |               |          | N                   |               |          | N              |               |          | N               |               |          | N              |               |          |
| <b>Geschlecht</b>                 | <i>unbekannt</i>                       | 9              | 5%            |          | 8                   | 3%            |          |                |               |          | 2               | 1%            |          | 3              | 3%            |          |
|                                   | <i>männlich</i>                        | 65             | 36%           |          | 121                 | 44%           |          | 22             | 35%           |          | 99              | 57%           |          | 51             | 49%           |          |
|                                   | <i>weiblich</i>                        | 106            | 59%           |          | 147                 | 53%           |          | 41             | 65%           |          | 74              | 42%           |          | 50             | 48%           |          |
|                                   |  | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>            | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>        | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> |
| <b>Alter</b>                      |  | 171            | 69.3          | 6.3      | 270                 | 44.6          | 7.7      | 63             | 46.3          | 5.0      | 173             | 44.2          | 4.7      | 103            | 21.8          | 3.9      |
| <b>Raucher-Status</b>             | <i>nicht bestimmbar</i>                | 11             | 6%            |          | 12                  | 4%            |          | 1              | 2%            |          | 2               | 1%            |          | 2              | 2%            |          |
|                                   | <i>Nieraucher</i>                      | 84             | 47%           |          | 74                  | 27%           |          | 16             | 25%           |          | 20              | 11%           |          | 45             | 43%           |          |
|                                   | <i>Gelegenheitsraucher<sup>s</sup></i> | 1              | 1%            |          | 3                   | 1%            |          | 1              | 2%            |          | 1               | 1%            |          | 2              | 2%            |          |
|                                   | <i>Ex-Raucher</i>                      | 51             | 28%           |          | 68                  | 25%           |          | 18             | 29%           |          | 26              | 15%           |          | 2              | 2%            |          |
|                                   | <i>Raucher</i>                         | 33             | 18%           |          | 119                 | 43%           |          | 27             | 43%           |          | 126             | 72%           |          | 53             | 51%           |          |
|                                   |  | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>            | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>        | <b>Mittel</b> | <b>s</b> | <b>N</b>       | <b>Mittel</b> | <b>s</b> |
| <b>Alter bei erster Zigarette</b> | <i>gesamt</i>                          | 85             | 21.9          | 9.1      | 190                 | 17.5          | 4.0      | 46             | 17.9          | 4.2      | 153             | 16.8          | 3.6      | 57             | 15.7          | 2.4      |
|                                   | <i>Männlich</i>                        | 48             | 19.6          | 4.9      | 89                  | 17.2          | 3.7      | 15             | 18.0          | 2.3      | 91              | 16.9          | 3.9      | 32             | 15.5          | 2.4      |
|                                   | <i>Weiblich</i>                        | 37             | 24.9          | 12.0     | 99                  | 17.8          | 4.2      | 31             | 17.9          | 4.9      | 62              | 16.5          | 3.1      | 24             | 16.1          | 2.4      |
| <b>Packyears</b>                  | <i>gesamt</i>                          | 168            | 10.6          | 16.0     | 253                 | 12.8          | 16.5     | 58             | 10.9          | 14.9     | 166             | 21.0          | 15.9     | 98             | 2.6           | 4.3      |
|                                   | <i>männlich</i>                        | 64             | 16.4          | 18.5     | 112                 | 16.0          | 20.2     | 21             | 16.6          | 21.3     | 93              | 24.0          | 15.9     | 49             | 3.1           | 4.6      |
|                                   | <i>weiblich</i>                        | 104            | 7.0           | 13.0     | 139                 | 10.2          | 12.1     | 37             | 7.7           | 8.3      | 73              | 17.1          | 15.1     | 47             | 2.1           | 3.9      |

<sup>s</sup> Gelegenheitsraucher sind Raucher mit <1 Packyears, die mehr als ein Jahr geraucht haben

s Standardabweichung

# Familienstudie

Tabelle 29 Beschreibung der Studienteilnehmer: Strahlenempfindlichkeit

|                       | Eltern                |                     |         |        | Geschwister |         |        |        | Kinder |        |        |        |        |
|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------|--------|-------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       | n                     | Mittel              | s       | Median | n           | Mittel  | s      | Median | n      | Mittel | s      | Median |        |
| <b>InTOM</b>          | <b>Basisschaden</b>   | 173                 | -0.77   | 0.78   | -0.9        | 271     | -0.72  | 0.80   | -0.9   | 100    | -0.79  | 0.66   | -0.9   |
|                       | <b>Initialschaden</b> | 178                 | 1.58    | 0.40   | 1.6         | 275     | 1.61   | 0.41   | 1.6    | 103    | 1.57   | 0.42   | 1.6    |
|                       | <b>10 min</b>         | 176                 | 0.75    | 0.45   | 0.7         | 274     | 0.75   | 0.46   | 0.7    | 104    | 0.74   | 0.38   | 0.7    |
|                       | <b>30 min</b>         | 174                 | -0.04   | 0.63   | -0.0        | 275     | -0.06  | 0.61   | -0.0   | 104    | -0.20  | 0.68   | -0.1   |
|                       | <b>60 min</b>         | 175                 | -0.48   | 0.68   | -0.5        | 274     | -0.56  | 0.72   | -0.6   | 101    | -0.74  | 0.71   | -0.7   |
|                       | <b>DRC</b>            |                     |         |        |             |         |        |        |        |        |        |        |        |
|                       | <b>10 min</b>         | 164                 | 0.44    | 0.49   | 0.4         | 270     | 0.45   | 0.76   | 0.4    | 99     | 0.37   | 0.19   | 0.4    |
|                       | <b>30 min</b>         | 165                 | 0.81    | 0.61   | 0.7         | 271     | 0.89   | 1.96   | 0.7    | 99     | 0.76   | 0.32   | 0.7    |
|                       | <b>60 min</b>         | 165                 | 1.01    | 0.55   | 0.9         | 270     | 1.14   | 2.21   | 0.9    | 98     | 0.99   | 0.40   | 0.9    |
|                       | <b>logit %DNA</b>     | <b>Basisschaden</b> | 173     | -3.02  | 0.76        | -3.0    | 271    | -2.90  | 0.83   | -3.0   | 100    | -3.00  | 0.78   |
| <b>Initialschaden</b> |                       | 178                 | -1.24   | 0.37   | -1.2        | 275     | -1.23  | 0.42   | -1.2   | 103    | -1.29  | 0.31   | -1.3   |
| <b>10 min</b>         |                       | 176                 | -1.84   | 0.49   | -1.9        | 274     | -1.81  | 0.52   | -1.8   | 104    | -1.90  | 0.46   | -1.9   |
| <b>30 min</b>         |                       | 174                 | -2.56   | 0.65   | -2.5        | 275     | -2.52  | 0.66   | -2.5   | 104    | -2.69  | 0.78   | -2.6   |
| <b>60 min</b>         |                       | 175                 | -2.98   | 0.67   | -2.9        | 274     | -3.00  | 0.77   | -3.0   | 101    | -3.15  | 0.86   | -3.1   |
| <b>DRC</b>            |                       |                     |         |        |             |         |        |        |        |        |        |        |        |
| <b>10 min</b>         |                       | 164                 | 1.25    | 11.05  | 0.4         | 270     | 0.33   | 1.64   | 0.3    | 99     | 0.40   | 0.77   | 0.4    |
| <b>30 min</b>         |                       | 165                 | 2.41    | 15.51  | 0.7         | 271     | 0.64   | 3.59   | 0.7    | 99     | 1.01   | 1.83   | 0.8    |
| <b>60 min</b>         |                       | 165                 | 3.06    | 23.08  | 1.0         | 270     | 1.11   | 3.41   | 1.0    | 98     | 1.30   | 2.17   | 1.0    |
| <b>InTOM</b>          |                       |                     | Partner |        |             | Proband |        |        |        | Gesamt |        |        |        |
|                       |                       | n                   | Mittel  | S      | Median      | n       | Mittel | s      | Median | n      | Mittel | s      | Median |
|                       | <b>Basisschaden</b>   | 61                  | -0.52   | 0.69   | -0.6        | 160     | -0.79  | 0.81   | -1.0   | 765    | -0.74  | 0.77   | -0.9   |
|                       | <b>Initialschaden</b> | 63                  | 1.62    | 0.33   | 1.6         | 172     | 1.56   | 0.33   | 1.5    | 791    | 1.59   | 0.39   | 1.6    |
|                       | <b>10 min</b>         | 63                  | 0.90    | 0.35   | 0.9         | 174     | 0.76   | 0.50   | 0.7    | 791    | 0.76   | 0.45   | 0.7    |
|                       | <b>30 min</b>         | 63                  | 0.03    | 0.47   | -0.0        | 169     | -0.12  | 0.66   | -0.1   | 785    | -0.08  | 0.63   | -0.1   |
|                       | <b>60 min</b>         | 63                  | -0.58   | 0.67   | -0.5        | 169     | -0.52  | 0.68   | -0.5   | 782    | -0.56  | 0.70   | -0.6   |
|                       | <b>DRC</b>            |                     |         |        |             |         |        |        |        |        |        |        |        |
|                       | <b>10 min</b>         | 61                  | 0.35    | 0.36   | 0.4         | 155     | 0.38   | 0.29   | 0.3    | 749    | 0.41   | 0.54   | 0.4    |
|                       | <b>30 min</b>         | 61                  | 0.67    | 1.32   | 0.7         | 155     | 0.81   | 0.65   | 0.7    | 751    | 0.82   | 1.30   | 0.7    |
| <b>60 min</b>         | 60                    | 0.99                | 0.97    | 1.0    | 152         | 1.00    | 0.56   | 0.9    | 745    | 1.05   | 1.42   | 0.9    |        |
| <b>logit %DNA</b>     | <b>Basisschaden</b>   | 61                  | -2.63   | 0.82   | -2.7        | 160     | -2.95  | 0.86   | -3.0   | 765    | -2.93  | 0.82   | -3.0   |
|                       | <b>Initialschaden</b> | 63                  | -1.26   | 0.31   | -1.2        | 172     | -1.25  | 0.33   | -1.2   | 791    | -1.25  | 0.37   | -1.2   |
|                       | <b>10 min</b>         | 63                  | -1.72   | 0.45   | -1.7        | 174     | -1.86  | 0.52   | -1.9   | 791    | -1.83  | 0.50   | -1.9   |
|                       | <b>30 min</b>         | 63                  | -2.53   | 0.50   | -2.6        | 169     | -2.56  | 0.70   | -2.5   | 785    | -2.56  | 0.68   | -2.5   |
|                       | <b>60 min</b>         | 63                  | -2.89   | 0.80   | -2.7        | 169     | -2.88  | 0.77   | -2.9   | 782    | -2.98  | 0.77   | -2.9   |
|                       | <b>DRC</b>            |                     |         |        |             |         |        |        |        |        |        |        |        |
|                       | <b>10 min</b>         | 61                  | 0.34    | 1.08   | 0.4         | 155     | 0.13   | 3.98   | 0.4    | 749    | 0.50   | 5.58   | 0.4    |
|                       | <b>30 min</b>         | 61                  | 0.56    | 4.27   | 0.8         | 155     | 0.47   | 7.06   | 0.7    | 751    | 1.04   | 8.36   | 0.7    |
|                       | <b>60 min</b>         | 60                  | 1.06    | 3.36   | 1.2         | 152     | 0.47   | 7.96   | 0.9    | 745    | 1.43   | 11.69  | 1.0    |

s Standardabweichung, DRC...DNA-Reparaturkapazität

III.5.3. Ergebnisse

Schätzung der Heritabilität in der Familienstudie

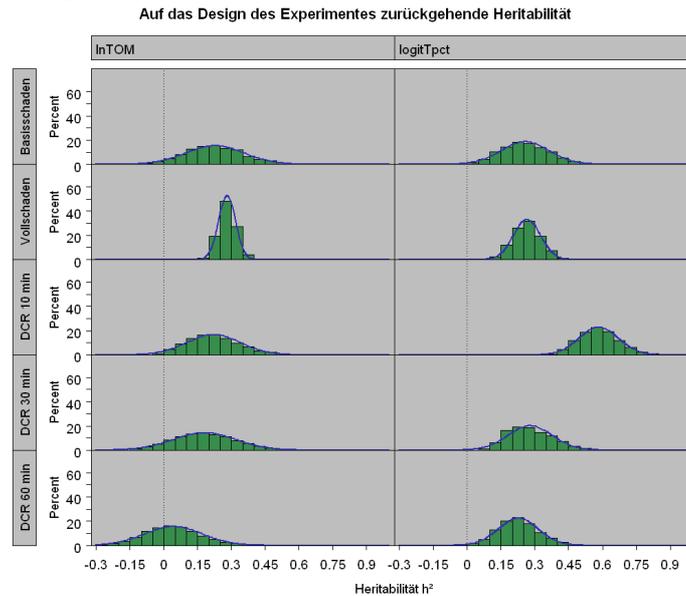
**Ermittlung design-induzierten Verzerrung der Heritabilitätsschätzung**

Für die Pseudo-Familien aus KORA-Kontrollen wurde im Allgemeinen eine Heritabilität um die 20% beobachtet. Dies zeigt, dass die durchgeführten Korrekturen der Werte anhand der humanen Kontrolle die Einflüsse des Experimentdesigns oder der Experimentdurchführung nicht vollständig egalisieren konnten. Die mittlere Pseudo-Heritabilität des DCR<sub>10 Minuten</sub> für den logit-%DNA erweist sich mit  $h^2_{Pseudo} = 0,58$  als besonders hoch und war in allen 3000 Zufalls-Replikationen signifikant von 0 verschieden (maximaler p-Wert: 0.01). (Tabelle 30 und Abbildung 22)

**Tabelle 30: Schätzung der Pseudo-Heritabilität**

|                  |                                      | Fehler der Heritabilitätsschätzung $h^2_F$ |             |            | p-Wert |                 |
|------------------|--------------------------------------|--|-------------|------------|--------|-----------------|
|                  |                                      | Mittel                                     | 95%-CI      | Min-Max    | Mittel | Min-Max         |
| <b>InTOM</b>     | Basisschaden                         | 23%  | (22% - 23%) | -18% - 67% | 0.1860 | 0.0000 - 0.9992 |
|                  | strahlungsinduzierter Initialschaden | 28%  | (28% - 28%) | 15% - 42%  | 0.0074 | 0.0000 - 0.1275 |
|                  | Reparatur 10 min                     | 22%  | (22% - 23%) | -8% - 79%  | 0.1900 | 0.0000 - 0.9995 |
|                  | Reparatur 30 min                     | 18%  | (18% - 19%) | -31% - 74% | 0.2875 | 0.0000 - 0.9994 |
|                  | Reparatur 60 min                     | 04%  | (04% - 05%) | -51% - 70% | 0.5031 | 0.0005 - 0.9998 |
| <b>Logit%DNA</b> | Basisschaden                         | 26%  | (25% - 26%) | -3% - 61%  | 0.1183 | 0.0000 - 0.9951 |
|                  | strahlungsinduzierter Initialschaden | 27%  | (26% - 27%) | 6% - 46%   | 0.0303 | 0.0000 - 0.5239 |
|                  | Reparatur 10 min                     | 58%  | (58% - 59%) | 34% - 95%  | 0.0001 | 0.0000 - 0.0100 |
|                  | Reparatur 30 min                     | 28%  | (28% - 28%) | 3% - 69%   | 0.0472 | 0.0000 - 0.8058 |
|                  | Reparatur 60 min                     | 23%  | (22% - 23%) | -1% - 58%  | 0.1565 | 0.0001 - 0.9812 |

Abbildung 22: Schätzung des Fehlers der Heritabilitätsschätzung



**Schätzung der nominalen Heritabilität**

Für die Schätzung der (nominalen) Heritabilität standen zwischen 209 und 221 2-Generationen-Familien zur Verfügung, wobei ca. 4 von 10 in die „mid-parent-offspring“- , die Restlichen in die „one-parent-offspring“- Regression eingingen.

Sowohl mittels lnTOM als auch mittels logit %DNA konnte eine **Heritabilität von ~77%** (95%-CI: 63%-91%) für den **Basisschaden** geschätzt werden. Eine ähnlich hohe Heritabilität (75%; 95%-CI: 62%-88%) ergibt sich für den strahlungsinduzierter Initialschaden , bemessen am lnTOM. Deutlich geringer (53%; 95%-CI: 38%-69%) jedoch fällt die Schätzung der Heritabilität des strahleninduzierter Initialschadens bemessen am logit %DNA aus. Auch wenn die Höhe der geschätzten Heritabilität vom gewählten Schadensmaß (lnTOM bzw. logit %DNA) abhängt, zeigt sich, dass die Heritabilität der Reparaturfähigkeit niedriger ist als die von Basis- und strahlungsinduzierter Initialschaden und mit der Dauer nach Bestrahlung abnimmt (siehe Tabelle 31 und Abbildung 23).

**Tabelle 31 geschätzte (nominale) Heritabilität  $\hat{h}_{nominal}^2$**

| Schaden                            | $\hat{h}_{nominal}^2$ (95% - CI) |                 |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------|
|                                    | lnTOM                            | logit %DNA      |
| Basisschaden                       | 77% (63% - 91%)                  | 77% (64% - 91%) |
| strahleninduzierter Initialschaden | 75% (62% - 88%)                  | 53% (38% - 69%) |
| Reparatur 10 min                   | 56% (45% - 67%)                  | 21% (6% - 36%)  |
| Reparatur 30 min                   | 34% (24% - 43%)                  | 11% (5% - 17%)  |
| Reparatur 60 min                   | 50% (36% - 65%)                  | 10% (2% - 18%)  |

$h^2$  adjustiert für Alter, Geschlecht und Versuch (Wert der humanen Referenz des entsprechenden Versuchs)

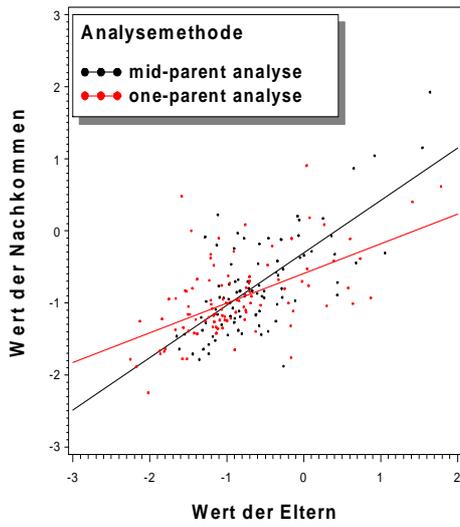
### Korrektur der nominalen Heritabilität

Die korrigierten Schätzwerte zeigen sowohl für InTOM als auch für logit %DNA eine Heritabilität von 70% für den Basisschaden auf. Der strahleninduzierte Initialschaden ist unter Verwendung von InTOM ähnlich hoch, beträgt bei logit %DNA jedoch nur noch ca. die Hälfte der Heritabilität des Basisschadens. Bemessen am InTOM, kann für die DNA-Reparaturfähigkeiten eine Heritabilität von ~20%-40% beobachtet werden. Diese ist geringer als die des Voll- und Basisschadens. Bemessen am logit %DNA kann für die DNA-Reparaturfähigkeiten keine heritable Komponente mehr beobachtet werden.

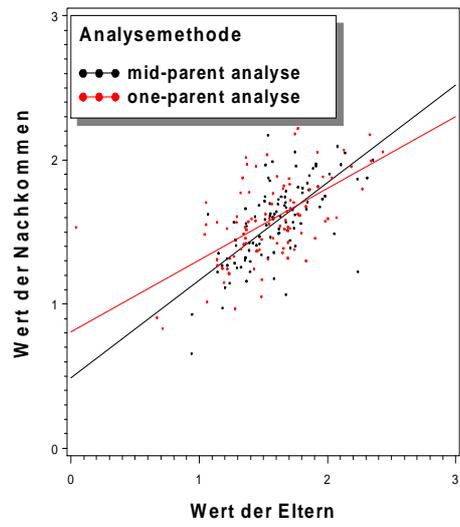
**Tabelle 32** korrigierte Heritabilität  $\hat{h}^2$

| Schaden                              | InTOM   |   | logit %DNA  |   |
|--------------------------------------|---|---|---|---|
|                                      | design-induzierter Fehler<br>$h_F^2$<br>(Korrekturterm) | korrigierte Heritabilität<br>$h_{korr}^2$ | design-induzierter Fehler<br>$h_F^2$<br>(Korrekturterm) | korrigierte Heritabilität<br>$h_{korr}^2$ |
| Basisschaden                         | 23%   | 70% (52% – 88%)                           | 26%   | 69% (51% – 88%)                           |
| strahlungsinduzierter Initialschaden | 28%   | 65% (47% – 83%)                           | 27%   | 36% (15% – 58%)                           |
| Reparatur 10 min                     | 22%   | 44% (29% – 58%)                           | 58%   | --  |
| Reparatur 30 min                     | 18%   | 20% (07% – 30%)                           | 28%   | --  |
| Reparatur 60 min                     | 04%   | 48% (33% – 64%)                           | 23%   | --  |

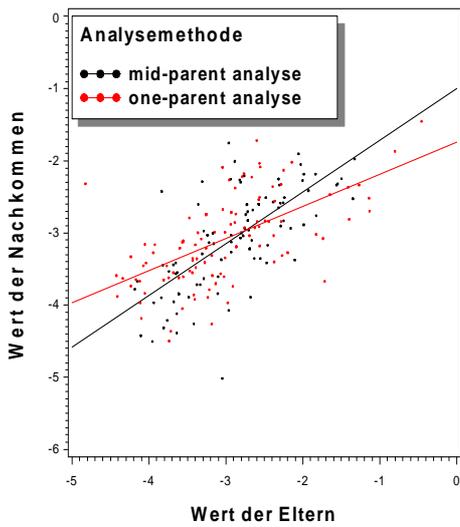
Abbildung 23: Parent-Offspring Regression  
InTOM Basisschaden



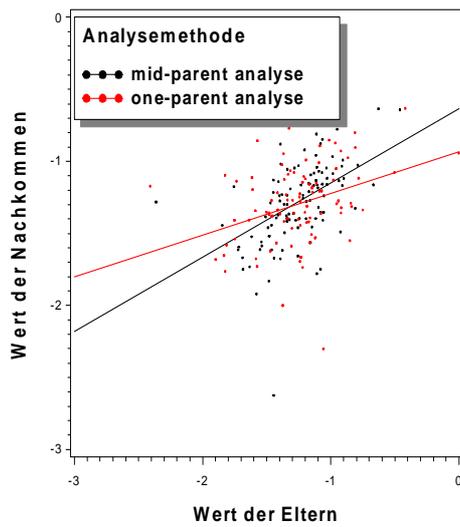
InTOM Vollschaden



logit %DNA Basisschaden



logit %DNA Vollschaden



---

### *Genetische Assoziation zu Lungenkrebs*

---

Drei Marker aus zwei Genen (*hOOG1* und *XRCC1*) des BER- Reparaturweges, und drei Marker aus zwei Genen (*PCNA* und *MRE11A*) des NHEJ- Reparaturweges zeigten ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht im RC-TDT. Die geschätzte FDR war für alle Marker  $<0.5$  (siehe Tabelle 33)

#### *BER*

Bei dem genomischen Marker **rs3213334** des Gens **XRCC1** wurde von den 68 direkt bei den Eltern beobachteten selteneren Allelen T 26 mal an das erkrankte Kind (LK-Patient) vererbt, 42 mal jedoch nicht. Bei dem Marker **rs2682585** waren es 27 vererbte zu 38 nicht vererbte Allele. Mit  $p=0,0287$  und  $p=0,0299$  weicht das Verhältnis vererbter zu nicht vererbter Allele signifikant von dem zu erwartenden Verhältnis von 1:1 ab. Es darf davon ausgegangen werden, dass die Marker mit einer in die Krankheitsentstehung involvierten DNA-Variante im Kopplungsungleichgewicht stehen. Mit  $p=0,0159$  lässt sich ähnliches für den Marker **rs2072668** des Gens **hOGG1** beobachten, auch wenn dies aus der Transmission der direkt beobachtbaren elterlichen Allele nicht ersichtlich wird.

#### *NHEJ*

Ein signifikantes Ergebnis konnte für den Marker **rs3729558** des Gens **PCNA** beobachtet werden. Selbst nach Korrektur für multiples Testen nach Sidak kann mit  $p=0,0194$  auf ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht geschlossen werden. Von den 152 direkt bei den Eltern beobachteten selteneren Allelen G wurden 90 an das erkrankte Kind (LK-Patient) vererbt, 62 jedoch nicht. Für zwei Marker des Gens **MRE11A** (**rs499952** und **rs1270146**) konnte ebenfalls mit  $p=0,0378$  und  $p=0,0410$  auf ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht geschlossen werden.

#### *MMR*

Für keinen der Marker dieses Reparaturweges konnte ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht beobachtet werden.

#### *Apoptose*

Für den untersuchten Marker dieses Reparaturweges konnte kein signifikantes Kopplungsungleichgewicht beobachtet werden.

**Tabelle 33: Signifikante häufige/seltene Transmission des selteneren Allels an LK-Patienten (RC-TDT):  $p < 0,05$**

| Gen                                      | SNP       | s. Allel | exakter p-Wert | Sidak p-Wert | FDR    | Anzahl beob. Eltern | Anzahl elterliche Allele | Transmission / Nicht-Transmission* |
|--|-----------|----------|----------------|--------------|--------|---------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |           |          |                |              |        |                     |                          |                                    |
| hOGG1                                    | rs2072668 | G        | * 0.0159       | 0.6062       | 0.3970 | 111                 | 67                       | 33/ 34 = 0.97:1                    |
| XRCC1                                    | rs3213334 | T        | * 0.0287       | 0.8159       | 0.3970 | 92                  | 68                       | 26/ 42 = 0.62:1                    |
|  | rs2682585 | A        | * 0.0299       | 0.8284       | 0.3970 | 110                 | 65                       | 27/ 38 = 0.71:1                    |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |           |          |                |              |        |                     |                          |                                    |
| PCNA                                     | rs3729558 | G        | ** 0.0003      | ** 0.0194    | 0.0196 | 106                 | 152                      | 90/ 62 = 1.45:1                    |
| MRE11A                                   | rs499952  |          | * 0.0378       | 0.8935       | 0.3970 | 99                  | 99                       | 47/ 52 = 0.90:1                    |
|  | rs1270146 | C        | * 0.0410       | 0.9122       | 0.3970 | 109                 | 146                      | 75/ 71 = 1.06:1                    |

FDR False Discovery Rate

exakter p-Wert lokaler p-Wert des RC-TDT

Sidak p-Wert für multiples Testen adjustierter p-Wert nach Sidak

s. Allel selteneres Allel

Transmission/Nicht-Transmission: Anzahl an den LK-Patienten vererbte / nicht vererbt s. Allele

---

### *Genetische Marker hinsichtlich Strahlenempfindlichkeit*

---

Bei 11 der untersuchten Gene zeigte sich bei mindestens einem Marker (insgesamt 24 Markern) mindestens eine signifikante „Assoziation“ je Zielgröße (Basis- oder strahleninduzierter Initialschaden oder zur Reparatur nach 10, 30 bzw. 60 Minuten) und Schadensmaß (lnTOM oder logit %DNA) (siehe Tabelle 34 und Tabelle 35). Es fällt auf, dass bei 8 der 11 auffälligen Gene (Ausnahmen: XRCC1, MSH und hOGG1) einzelne Marker sowohl hinsichtlich lnTOM als auch logit %DNA Signifikanzen aufweisen. 7 Marker aus 3 Genen wiesen für denselben Schaden sowohl hinsichtlich lnTOM als auch logit %DNA Signifikanzen auf (*PARP1* - rs3754376 – Basisschaden; *ATM* - rs228589 - rs664677 - rs611646 - Reparatur 30 min, rs170548 – Initialschaden; *XRCC4* - rs2075685 - Initialschaden, rs1193693 – Initialschaden).

#### *BER*

Die Marker **rs3754376 (PARP1)** und **rs2072668 (hOGG1)** zeigten signifikante Assoziationen zum Basisschaden bemessen am logit DNA, der PARP1-Marker auch bemessen am lnTOM.

#### *NHEJ*

Die Marker **rs228589, rs664677 und rs611646** des *ATM*-Gens (diese gehören zu einem genomischen Block mit höherem LD) zeigten für die **Reparatur nach 30 Minuten** signifikante Assoziationen auf, übereinstimmend für lnTOM und für logit %DNA. Für die Reparatur nach 60 Minuten konnten überdies signifikante Assoziationen hinsichtlich logit %DNA beobachtet werden. Hinsichtlich lnTOM waren ebenfalls niedrige p-Werte zu beobachten (zwischen 0.06 und 0.10). Für den Marker **rs170548** kann übereinstimmend zwischen lnTOM und logit %DNA eine signifikante Assoziation hingegen zum **strahleninduzierten Initialschaden** beobachtet werden.

Die Marker **rs2075685 und rs1193693** des Gens *XRCC4* wiesen übereinstimmend zwischen lnTOM und logit %DNA signifikante Assoziationen zum **strahleninduzierten Initialschaden** auf.

Der Marker **rs499952** des Gens *MRE11A* wies nur hinsichtlich lnTOM eine signifikante Assoziation zum **strahleninduzierter Initialschaden** auf. Hinsichtlich dem logit %DNA war der p-Wert mit  $p=0,0948$  niedrig, die Signifikanz wurde jedoch verfehlt.

#### *MMR*

Zwar konnte hinsichtlich lnTOM für den Marker rs1981929 (*MSH2*) eine signifikante Assoziation zur Reparatur nach 60 Minuten und für den Marker rs3729558 (*PCNA*) Initialschaden beobachtet werden, hinsichtlich dem logit %DNA wurden diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt. Ebenso konnte für den Marker rs25405 (*PCNA*) hinsichtlich dem logit %DNA eine signifikante Assoziation zum Basisschaden beobachtet werden. Dies konnte jedoch hinsichtlich lnTOM nicht bestätigt werden.

#### *Apoptose*

Die Marker rs2317130 und rs8179181 des *TGFB1*-Gens weisen zwar mal für lnTOM mal für den logit %DNA signifikante Assoziationen zum Basisschaden und zur Reparatur nach 10 bzw. 60 Minuten auf. Diese Ergebnisse waren jedoch zwischen den Zielgrößen nicht konsistent.

Tabelle 34: FBAT: Test Assoziation zu Strahlenempfindlichkeit: signifikante genomisch Marker ( $p < 0.05$ ): InTOM

| Gen                                      | Marker | rs Nr.    | Basisschaden | strahlungsinduzierter Initialschaden | Reparatur 10 min | Reparatur 30 min | Reparatur 60 min |
|--|--------|-----------|--------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| PARP1                                    | 3      | rs3754376 | * 0.0206     | * 0.0288                             | 0.3304           | 0.2708           | 0.7666           |
| XRCC1                                    | 1      | rs2030404 | * 0.0273     | 0.1849                               | 0.0550           | 0.0765           | 0.1917           |
|  | 2      | rs25487   | ** 0.0040    | 0.5929                               | 0.1105           | 0.3670           | 0.2550           |
|  | 5      | rs1001581 | ** 0.0083    | 0.6326                               | 0.2304           | 0.4601           | 0.4596           |
|  | 6      | rs3213245 | * 0.0413     | 0.1097                               | 0.0787           | 0.0839           | 0.3014           |
|  | 2      | rs2072668 | * 0.0180     | 0.1567                               | 0.1347           | 0.1443           | 0.2029           |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| ATM                                      | 1      | rs228589  | 0.5059       | 0.8325                               | 0.2179           | * 0.0189         | 0.0614           |
|  | 2      | rs664677  | 0.5650       | 0.6882                               | 0.2112           | * 0.0200         | 0.1006           |
|  | 4      | rs611646  | 0.2911       | 0.2414                               | * 0.0493         | ** 0.0091        | 0.0717           |
|  | 6      | rs170548  | 0.7237       | * 0.0430                             | 0.2826           | * 0.0467         | 0.3988           |
| LIG4                                     | 1      | rs9587525 | 0.4743       | 0.0674                               | 0.1457           | 0.1351           | * 0.0389         |
|  | 4      | rs1805388 | 0.4640       | 0.3401                               | 0.3220           | * 0.0362         | 0.1305           |
| MRE11A                                   | 6      | rs499952  | 0.7973       | * 0.0202                             | 0.3164           | 0.3494           | 0.3097           |
| RAD50                                    | 2      | rs2237060 | 0.7806       | 0.0869                               | 0.2632           | * 0.0425         | 0.2892           |
| XRCC4                                    | 1      | rs2075685 | 0.1187       | * 0.0351                             | 0.0596           | 0.1218           | * 0.0395         |
|  | 3      | rs1382367 | 0.1333       | 0.2524                               | * 0.0129         | * 0.0280         | * 0.0357         |
|  | 5      | rs1193693 | 0.1926       | * 0.0382                             | 0.2811           | 0.7290           | 0.3997           |
| <b>Miss Match Repair (MMR)</b>           |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| MSH2                                     | 2      | rs1981929 | 0.3024       | 0.3091                               | 0.4123           | 0.5579           | * 0.0209         |
| PCNA                                     | 1      | rs3729558 | 0.3480       | * 0.0119                             | 0.2978           | 0.2715           | 0.0550           |
| <b>Apoptose</b>                          |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| TGFB1 (B9D2)                             | 2      | rs2317130 | 0.1522       | 0.2926                               | * 0.0445         | 0.2357           | 0.5732           |

Für alle Marker mit einem  $p$ -Wert  $< 0.05$  (grau unterlegt) konnte eine  $FDR < 0.5$  bestimmt werden.

Tabelle 35: FBAT: Test Assoziation zu Strahlenempfindlichkeit: signifikante genomisch Marker ( $p < 0.05$ ): logit %DNA

| Gen                                      | Marker | rs Nr.    | Basisschaden | strahlungsinduzierter Initialschaden | Reparatur 10 min | Reparatur 30 min | Reparatur 60 min |
|--|--------|-----------|--------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Base Excision Repair (BER)</b>        |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| PARP1                                    | 3      | rs3754376 | * 0.0127     | 0.6043                               | 0.3147           | 0.8438           | 0.3074           |
| hOGG1                                    | 2      | rs2072668 | * 0.0101     | 0.3111                               | 0.8278           | 0.1202           | * 0.0320         |
| <b>Non Homologous End Joining (NHEJ)</b> |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| ATM                                      | 1      | rs228589  | 0.1727       | 0.3427                               | 0.3073           | * 0.0139         | * 0.0110         |
|  | 2      | rs664677  | 0.3026       | 0.4196                               | 0.3445           | * 0.0163         | ** 0.0092        |
|  | 4      | rs611646  | 0.2769       | 0.0574                               | 0.2849           | * 0.0343         | * 0.0369         |
|  | 6      | rs170548  | 0.8556       | * 0.0308                             | 0.4727           | 0.0763           | 0.2224           |
| LIG4                                     | 1      | rs9587525 | 0.5883       | * 0.0216                             | 0.3624           | 0.3006           | 0.1152           |
|  | 2      | rs1151403 | 0.5940       | ** 0.0032                            | 0.2212           | 0.3013           | 0.2962           |
| MRE11A                                   | 1      | rs663530  | * 0.0224     | 0.3994                               | 0.1000           | * 0.0467         | 0.0535           |
|  | 3      | rs552126  | * 0.0290     | 0.4415                               | 0.2095           | 0.0726           | 0.1057           |
|  | 4      | rs3017077 | * 0.0255     | 0.5819                               | 0.1218           | 0.0931           | 0.3788           |
|  | 6      | rs499952  | 0.2629       | 0.0948                               | 0.1840           | * 0.0195         | ** 0.0086        |
|  | 9      | rs659349  | 0.0863       | 0.2129                               | 0.2132           | * 0.0398         | 0.1303           |
| RAD50                                    | 1      | rs2706348 | * 0.0191     | 0.0505                               | 0.1058           | 0.2894           | 0.0638           |
| XRCC4                                    | 1      | rs2075685 | 0.2817       | * 0.0169                             | 0.4473           | 0.2525           | 0.5284           |
|  | 2      | rs1478486 | 0.1558       | * 0.0431                             | 0.1892           | 0.1529           | 0.1854           |
|  | 5      | rs1193693 | * 0.0499     | * 0.0385                             | 0.3183           | 0.2279           | 0.4811           |
| <b>Miss Match Repair (MMR)</b>           |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| PCNA                                     | 3      | rs25405   | * 0.0317     | 0.2441                               | 0.1937           | 0.1205           | 0.2639           |
| <b>Apoptose</b>                          |        |           |              |                                      |                  |                  |                  |
| TGFB1                                    | 1      | rs8179181 | * 0.0405     | 0.2626                               | 0.2607           | 0.3752           | * 0.0433         |

Für alle Marker mit einem  $p$ -Wert  $< 0.05$  (grau unterlegt) konnte eine  $FDR < 0.5$  bestimmt werden.

### **III.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse**

Ionisierende Strahlung gilt als gut etabliertes Karzinogen für humane Zellen und damit als Risikofaktor für Krebserkrankungen. Besonders Strahlung in niedrigen Dosen wurde als direkte Ursache für Doppelstrangbrüche der DNA beschrieben [Christakov 2008]. Ionisierende Strahlung induziert aber ebenso Basenschäden an der DNA. Die Auswirkungen dieser Schäden reichen von der Blockierung von Transkription oder Replikation über Mutagenese bis hin zum Zelltod. Zu ihrer Behebung existiert eine Vielzahl komplexer molekularer Mechanismen mit teilweise redundanter Funktion (BER: base excision Repair, NER: nucleotide excision repair“, NHEJ: non-homologous end joining, HR: homologous recombination, MMR: mismatch repair).

Lungenkrebs ist eine schwere Erkrankung, die durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden kann. Belege dafür liefern Studien zur Exposition von Radon in Wohnräumen (Darby et al. 2005; Wichmann et al. 2005), zum Risiko von Uranbergarbeitern (BEIR VI Report) und Untersuchungen von Überlebenden der Atombombenabwürfe auf Japan 1945, (Wakeford 2004; Boffetta et al. 2002). *„Inzwischen ist unbestritten, dass auch eine langjährige Radonbelastung in deutlich niedrigeren Konzentrationen – wie sie auch in Wohnungen vorkommen – Ursache für das Auftreten von Lungenkrebs sein kann.“* [Zitat aus BfS –Strahlenthemen, 2007]. Genomische Instabilität während der Karzinogenese ist in einer bemerkenswerten Vielzahl von Krebserkrankungen zu finden (Tischfield and Shao 2003). Es existieren Hinweise, dass Personen mit Lungenkrebs im jungen Alter ein instabileres Genom haben als die durchschnittliche Bevölkerung (Kreuzer et al. 1999) und die Erkrankungsrate an Lungenkrebs bei den Personen, die einer geringen Strahlendosis ausgesetzt waren, zum Beispiel durch das Edelgas Radon, erhöht ist (Kreuzer et al. 1999). Ein Zusammenhang zwischen individueller Strahlensensitivität und erhöhter Suszeptibilität für Krebs, abhängig vom Genotyp des Individuums, erscheint möglich. Die genauen Mechanismen strahlungsinduzierter Suszeptibilität sind aber weitgehend unbekannt.

Das Risiko für einen akuten oder späteren Schaden eines Organismus als Folge von Strahlenexposition ist in der Bevölkerung jedoch sehr heterogen. Mögliche Gründe für eine erhöhte individuelle Strahlenempfindlichkeit sind genetische Faktoren. Schwere, aber sehr selten phänotypisch in Erscheinung tretende Genmutationen (z.B. in den Genen ATM und NBS) wurden als Ursachen bereits gut charakterisiert.

Für die Untersuchung zu genetischen Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit in Lungenkrebsfamilien wurden insgesamt 12427 Einzelexperimente in 173 Versuchen des COMET-Assays an Biomaterial von 1204 Studienteilnehmern und einer humanen Referenz durchgeführt. Für die Fall-Kontroll-Studie standen nach dem Ausschluss nicht verwertbarer Experimente 4994 Einzelexperimente und Blut von 177 Fällen und 170 Kontrollen (und einer Humanen Referenz) zur Verfügung. Für die Familienstudie standen 5698 Einzelexperimente und Blut von 187 Indexpatienten und 611 Verwandten (und einer Humanen Referenz) zur Verfügung

---

#### *Validität des COMET-Assay zur Bestimmung von Strahleninduzierte DNA-Schäden*

Der alkaline COMET-Assay (Einzelzell-Elektrophorese) gilt als etablierte Technik zur Quantifizierung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur in jeglicher eukaryotischen Zelle. Für eine Reihe von exogenen Faktoren, wie Alter, Ernährung, Rauchen, Infektionen, Exposition von Sonnenlicht, ionisierende Strahlung etc. [Moller 2000, Wasson 2008] konnte ein Einfluss auf

die Ergebnisse des Assays gezeigt werden. Der COMET-Assay ist jedoch auch eine Methode mit mannigfaltigen, schwer kontrollierbaren, in ihrer Auswirkung unbekanntem endogenen Störeinflüssen, z. B. exakte experimentelle Strahlungs-dosis, Umweltstrahlung, exakte Reparaturzeit, von der im allgemein angenommen wird, dass diese die Ergebnisse nicht oder kaum beeinflussen. Da in diesem Projekt Assays an Blutproben aus einer Bevölkerung stammenden Studienpopulation nach einem unveränderten Protokoll über einen Zeitraum von fast 5 Jahren durchgeführt wurden und die Anzahl zu vermessender Zellen mit 200 je Einzelexperiment weit über den empfohlenen 50 Zellen lag, konnte der Einfluss von endogenen Faktoren untersucht werden.

Es stellte sich heraus, dass 14,8% der Variabilität in den Messwerten des TOM und 6,9% des Anteils DNA im Schwanz auf endogene Faktoren, und somit auf Randbedingungen in der Durchführung der Experimente, zurückgeführt werden können. Als die zwei wesentlichen Faktoren wurden der zeitliche Fortgang des Projektes und die Vermessungsdauer eines Einzel-experiments identifiziert. Beide sollten als Surrogat für unbekannt Mechanismen aufgefasst werden. Überdies wurde beobachtet, dass die Verzerrungen in den Messungen nicht homogen für Basisschaden, Initialschaden und Reparatur waren. Der Basisschaden war in der Regel am stärksten durch endogene Faktoren beeinflusst.

Eine Korrektur der gemessenen Zielgrößen vor der statistischen Auswertung der Daten wurde durchgeführt.

### *Schätzung der Heritabilität in der Familienstudie*

---

Heritabilität (der Erblichkeitsanteil) ist ein Maß des auf familiäre Komponenten zurückführbaren Anteils der phänotypischen Varianz und kann, wie in dieser Untersuchung, aus der Korrelation zwischen elterlichen und kindlichen Phänotypen geschätzt werden. Die Schätzung der Heritabilität ist jedoch relativ zu den genetischen und den Umwelteinflüssen einer Population und kann daher nicht als absoluter Beitrag der genetischen Faktoren zur phänotypischen Varianz angesehen werden. Die Schätzung der Heritabilität fällt z. B. höher aus, je komplexer die genetische Komponente ist oder je homogener Umwelteinflüsse sind [Falconer 1996].

Bei der Interpretation der in einem Experiment quantifizierten Heritabilität als Schätzung einer Populationseigenschaft, sollten stets die Rahmenbedingungen des Experimentes mitberücksichtigt werden. Die Rekrutierung der Familien dieser Untersuchung erfolgte stets über einen an in jungen Jahren an Lungenkrebs Erkrankten. Damit ist die Verallgemeinerung der Heritabilität auf die Gesamtbevölkerung eingeschränkt.

Die Heritabilität der Strahlenempfindlichkeit wurde bisher nur in wenigen Experimenten untersucht. Roberts et al. [1999] beobachteten eine Heritabilität von  $h^2=82\%$  in einem Kollektiv bestehend aus 20 selektierten Familien von Brustkrebspatienten mit hoher Strahlenempfindlichkeit, definiert als chromosomale Aberrationen. Wu et al. [2006] beobachteten eine Heritabilität von  $h^2=62,5\%$  in 460 Geschwistern (darunter 148 eineiige und 57 zweieiige Zwillingspaare) für den four-mutagen-sensitive-score induziert durch  $\gamma$ -Strahlung.

In dieser Untersuchung konnten wir eine ähnlich hohe Heritabilität für den strahleninduzierten Initialschaden, also ohne Reparatur, bemessen am lnTOM ( $h^2=65\%$ ) beobachten. Vielmehr zeigte sich, dass die Heritabilität des Basisschadens, also ohne experimentelle Bestrahlung, mit  $h^2=70\%$  noch höher lag. Die Schätzungen der Heritabilitäten bemessen als logit %DNA fielen geringer aus (Basisschaden:  $h^2=69\%$ , strahleninduzierter Initialschaden:  $h^2=36\%$ ). Mit Fortdauer der DNA-Reparatur sank die Heritabilität. Dies legt die Vermutung

nahe, dass die DNA-Stabilität stärker von genetischen Faktoren beeinflusst wird, als die Reparaturprozesse. Jedoch erhöht auch unvermeidbare Variabilität der Durchführung der Experimente die Gesamtvariabilität der Messungen des Phänotyps. Dies führt schließlich zu niedrigeren Schätzwerten der Heritabilität. Eine systematische, designbedingte Verzerrung der Schätzungen konnten wir durch Bestimmung und Korrektur anhand des Fehlers der Heritabilitätsschätzung aus den Experimenten der Fall-Kontrollstudie ausschließen.

In den untersuchten Probanden wurde eine sehr hohe Heritabilität des DNA-Basisschadens beobachtet. Dieser kann einerseits auf gemeinsame genetische Profile innerhalb einer Familie zurückgeführt werden, andererseits jedoch auch durch externe, eine Familie homogen betreffende Faktoren hervorgerufen werden, etwa natürlicher Hintergrundstrahlung (NBR: natural background radiation)

Neuere Übersichtsarbeiten aus Großbritannien zu Folge, ist die bevölkerungsweite Strahlenbelastung vornehmlich auf NBR (jährliche mittlere Belastung: 2,2 mSV) und weniger auf anthropogene (zivilisatorische) Strahlung (jährliche mittlere Belastung: 0,4 mSV) zurückzuführen [Kendall *et al.* 2006]. Für Deutschland gab das BfS jedoch ein ausgeglichenes Verhältnis von 1,9 : 2,1 mSv an [BfS 2007]. NBR ist geographisch jedoch nicht homogen verteilt. Sowohl für Großbritannien als auch für Deutschland wurden große interindividuelle Differenzen in der Strahlenbelastung durch terrestrische Strahlung, aber auch über die Nahrung aufgenommener Radionukleotide berichtet. Die Belastung durch kosmische Strahlung wies hingegen nur geringe Variabilität innerhalb des Körpers und zwischen Individuen auf [Kendall, Hughes, Oatway, and Jones 2006] [BfS 2007].

Kreuzer *et al.* [1999] beschrieben die Folgen einer Exposition durch das Edelgas Radon in geringer Strahlendosis, als Hauptkomponente der NBR, mit Lungenkrebs im jungen Alter aufgrund eines instabileren Genoms. Eine europaweite Meta-Analyse ergab, dass Radon in Häusern für 9% der Lungenkrebs- und für 2% der Krebssterblichkeit verantwortlich ist. Eine sekundäre Datenaufarbeitung aus Russland zeigt anhand von europäischen Sterblichkeitsraten der vergangenen 100 Jahre einen Zusammenhang mit der  $C^{14}$  Belastung der Umwelt [Germanskaia 2006]. Hingegen konnte eine 1983 publizierte irische Studie NBR als Risikofaktor für Krebs nicht bestätigen [Allwright *et al.* 1983].

Der Zusammenhang von NBS und Anpassungen/Veränderungen der DNA wurden in extrem hoch belasteten Regionen z.B. im Iran, in Indien oder der Ukraine untersucht. Bei Männern aus Kerala (Indien), der Region mit der weltweit höchsten NBR, wurde ein häufigeres Vorkommen von Mikrodeltionen und CNV (copy-number-variations) festgestellt [Premi *et al.* 2007]. In Ramsar (Iran), ebenfalls einer Gegend mit höherer NBR (effektive 20 mSy/Jahr), wurde bei Probanden eine höhere Suszeptibilität auf strahleninduzierte DNA-Schäden, aber auch eine geringere Anzahl an Micronuclei und eine höhere Apoptoserate nachgewiesen. [Mohammadi *et al.* 2006]. Des Weiteren wurde in stark durch Strahlung in Folge des Tschernobyl-Unfalls kontaminierten Familien eine 1,6-fach erhöhte Mutationsrate in der väterlichen Keimbahn beobachtet [Dubrova *et al.* 2002].

Ein Zusammenhang mit der familiär bedingten Strahlenreaktion und Umweltfaktoren muss aber noch nachgewiesen werden.

Es liese sich die Hypothese formulieren, dass sowohl die hohe beobachtete Heritabilität des DNA-Basis- als auch des strahlungsinduzierter Initialschadens durch NBR, ebenfalls in nicht extrem hoch belasteten Regionen, zumindest teilweise mit verursacht sein könnte. Ein Beleg hierfür kann aus dieser Untersuchung jedoch nicht abgeleitet werden.

### Genetische Marker hinsichtlich Strahlenempfindlichkeit

---

Die Assoziation zwischen genetischen Markern und der Strahlenempfindlichkeit wurde sowohl in der Fall-Kontroll- als auch in der Familienstudie untersucht.

Die Korrelation der Zielgrößen lnTOM und logit %DNA lag zwischen  $\rho=0,39$  und  $\rho=0,75$  (Initialschaden). Dies zeigt, dass die Messungen möglicherweise andere Aspekte der DNA-Schädigung widerspiegeln und daher nicht unbedingt zu vergleichbaren Ergebnissen führen müssen. Ein anderer Grund könnte eine verminderte Präzision in der Messung des DNA-Schadens mit dem COMET-Assay sein, sprich ein höherer Anteil experimenteller Variabilität. Unabhängig der Ursache sollte daher nicht angenommen werden, dass Assoziation mit beiden Zielgrößen gezeigt werden können.

Mit wenigen Ausnahmen konnte daher für beide Zielgrößen, lnTOM und logit %DNA, übereinstimmend signifikante Ergebnisse erzielt werden. In der hier durchgeführten Untersuchung konnten einige genetische Assoziation zur Strahlenempfindlichkeit beobachtet werden.

#### Basisschaden

Im BER-Reparaturweg (base excision repair) zeigte der Marker rs3213245 des Gens **XRCC1** eine signifikante Assoziation in der Familienstudie hinsichtlich des lnTOM ( $p=0.0413$ ). In der Fall-Kontroll-Studie zeigte der im selben LD-Block liegende Marker rs3113334 für Fälle und für Kontrollen signifikante Assoziationen.

Der Marker **rs3754376** im **PARP1**-Gen zeigte sowohl in der Familienstudie für beide Zielgrößen ( $p_{\ln\text{TOM}}=0.0206$ ,  $p_{\text{logit \%DNA}}=0.0127$ ) als auch unter den Fällen der Fall-Kontrollstudie hinsichtlich logit %DNA ( $p=0.0307$ ) signifikante Assoziationen.

#### Strahleninduzierter Initialschaden

Der Marker **rs3754376** im **PARP1**-Gen zeigte sowohl in der Familienstudie hinsichtlich lnTOM ( $p=0.0288$ ) als auch unter den Fällen der Fall-Kontrollstudie hinsichtlich logit %DNA ( $p=0.0307$ ) signifikante Assoziationen.

#### Reparatur nach 30 Minuten

Der Marker **rs1805388** aus dem **Lig4**-Gen zeigte hinsichtlich lnTOM in der Familienstudie ( $p=0.0362$ ) und für die Fälle der Fall-Kontroll-Studie ( $p=0.0308$ ) signifikante Assoziationen.

Der Marker **rs2237060** aus dem **Rad50** Gen zeigte hinsichtlich lnTOM in der Familienstudie ( $p=0.0425$ ) und unter den Kontrollen der Fall-Kontroll-Studie ( $p=0.0084$ ) signifikante Assoziationen. Bemessen am lnTOM zeigten Kontrollen eine genotypspezifische DNA-Reparatur, wobei das Allel C signifikant ( $p=0,0084$ ) die Reparatur hemmt. Bei Trägern des Genotyp AA waren nach 30 Minuten 81% des induzierten Schadens repariert, bei Genotyp CA 73% und bei Genotyp CC nur 68%. Unter Fällen ( $p=0,8485$ ) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

### Strahlenempfindlichkeit als Prädiktor für Lungenkrebs

---

Die Reparaturkapazität nach 30 Minuten wurde als eine signifikante Prognosegröße für Lungenkrebs in jungen Jahren beobachtet. Die geschätzte OR je 10% DRC betrug 0.86 (95%-CI: 0,75 – 1,00). Eine Differenz von 10% DRC entspricht grob dem beobachteten Unterschied

## Zusammenfassung und Diskussion

---

zwischen Fällen und Kontrollen. Der Einfluss der Reparaturkapazität auf das Risiko einer Lungenkrebskrankung in jungen Jahren entspricht damit etwa 10 pack years, rund der mittleren Rauchexposition unter den Kontrollen. Ferner konnte unter den Kontrollpersonen eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit des Basis- als auch des Initialschadens beobachtet werden, die unter Lungenkrebspatienten deutlich milder ausfiel.

### *DNA-Reparatur und Lungenkrebs*

---

Es wurden signifikante Unterschiede in der Reparaturkapazität eines DNA-Schadens zwischen Lungenkrebspatienten und gesunde Kontrollpersonen beobachtet. Die Beobachtungen waren jedoch zwischen den Zielgrößen (lnTOM und logit %DNA) kontrovers. Während Fälle bemessen am lnTOM nach 30 bzw. 60 Minuten weniger des induzierten Schadens repariert hatte, zeigten dies bemessen am logit %DNA eine schnellere Reparatur, die nach 60 Minuten jedoch mit denen der Kontrollen wieder vergleichbar war.

Eine Erklärung für diese paradoxe Beobachtung kann aus den vorliegenden Daten nicht gefunden werden. Jedoch lässt sich folgende Hypothese aufstellen: *„Bei Lungenkrebs, vornehmlich durch Tabakrauch verursacht, lösen inhalierte Karzinogene entzündliche Prozesse aus, die zu DNA-Schädigung führen können. Es kann vermutet werden, dass bei LK-Patienten andere Reparaturwege aktiviert werden als bei Gesunden. Diese lässt sich im COMET-Assay durch Unterschiede zwischen TOM und %DNA erkennen.“*

### *Abschließende Bemerkungen*

---

Endogene Faktoren, wie z.B. die Vermessungsdauer, können einen verzerrenden Einfluss auf die Messergebnisse des COMET-Assays nehmen. Eine Korrektur dieser Verzerrungen sollte vor der Auswertung und Interpretation der Messdaten durchgeführt werden.

In der Fachliteratur wurde der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die DNA-Reparatur kontrovers beschrieben (Møller 2000). Aus einer Übersicht mehrerer Studien ziehen Møller et al. den Schluss, dass wenn überhaupt, Alter und Geschlecht nur einen geringen Effekt auf den Basisschaden nimmt. Diese Beobachtung konnte sowohl in der Familienstudie als auch in der Fall-Kontroll-Studie wieder gefunden werden.

Die Zielgrößen TOM und %DNA im Schweif erwiesen sich nur als moderat miteinander korreliert. Während %DNA die direkt die schadensbedingte Menge an DNA im Schweif quantifiziert, wird der TOM aus zwei Messparametern (Anteil DNA im Schweif, mittlere Migrationstiefe in den Schweif) rechnerisch gebildet. %DNA geht dabei in die Größe TOM ein. Sowohl für TOM als auch für %DNA wurde eine sehr hohe Korrelation ( $>0.99$ ) zur Strahlendosis, und mit zur Intensität der Schädigung, gezeigt (Kumaravel und Jha 2005). Es ist daher zu vermuten, dass hier zwei unterschiedliche Teilaspekte der DNA-Schädigung in die Messung eingehen.

Es konnte eine bemerkenswerte Heritabilität des Basisschadens und des strahleninduzierten Initialschadens beobachtet werden. Die Heritabilität der DNA-Reparatur war geringer. Damit wurde gezeigt, dass familiäre Komponenten, z.B. Genetik oder auch eine ganze Familie betreffende Umweltfaktoren, Einfluss auf die DNA-Instabilität nehmen.

Für verschiedene genomische Marker konnten Assoziationen sowohl zu Lungenkrebs, als auch zur Strahlenempfindlichkeit beobachtet werden.

### **III.7 Voraussichtlicher Nutzen bzw. Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Eine Identifizierung von Genen, die für Strahlenempfindlichkeit prädisponierend sind und die Bestimmung der Segregationsmuster dieser Gene können einen weiteren Einblick in die individuelle Strahlenempfindlichkeit und in die Ätiologie von Krebs geben und damit dessen Therapiemöglichkeiten im Besonderen durch Strahlentherapie verbessern.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten einen eindeutigen heritablen Effekt für Strahlenempfindlichkeit, so dass eine Familienanamnese vor der Strahlentherapie durchaus sinnvoll erscheint. Der genetische Hintergrund für die Heritabilität der Strahlenempfindlichkeit konnte weder in der Fall-Kontroll-Untersuchung, noch in der Familienstudie eindeutig für die betrachteten Kandidatengene herausgearbeitet werden. Die Ergebnisse lassen sehr komplexe Vorgänge vermuten und können ein alleiniges zugrunde liegen von genetischen Effekten in DNA-Reparatur-Wegen nicht bestätigen. Hier bedarf es definitiv weiterer Untersuchungen - eventuell auch in einem genomweiten Maßstab.

Das FE-Vorhaben kann als Teil der Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit und deren familiäre und genetische Komponenten angesiedelt werden. Es dient zur Untersuchung der molekulargenetischen Mechanismen zur DNA-Reparatur sowie deren Bezug zur individuellen Strahlenempfindlichkeit und der Ätiologie des Lungenkrebses. Ein eindeutiger Messparameter oder Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit kann z.Z. aus der Studie nicht abgeleitet werden. Dadurch ist ein direkt daraus abgeleitbarer Nutzen derzeit weder für Prävention, Diagnose noch für Therapie gegeben. Die komplexen Zusammenhänge von Strahlenschäden an der DNA und der Reparatur müssen noch weiter untersucht werden, bevor ein unmittelbarer Nutzen bzw. Schadenbegrenzung daraus hervorgehen kann.

### **III.8 Fortschritte im Forschungsgebiet während der Durchführung des FE-Vorhabens**

Im Rahmen einer Untersuchung von LK-Patienten mit nachgewiesener Strahlensensitivität (diese stammen aus dem selben Kollektiv wie für dieses FE-Vorhaben herangezogen) wurden funktionelle Polymorphismen aus BRCA2, RAD18, LI1, und XPC auch mit Daten zur *in vitro* Strahlenempfindlichkeit korreliert. Es zeigten sich signifikante Assoziationen (nicht veröffentlichte Berichte).

Am Institut für Strahlenbiologie, am Institut für Biometrie und Epidemiologie und auch in einem vom BfS geförderten Ringprojekt wurde die Reproduzierbarkeit von Messungen der Strahlensensitivität an primären Lymphozyten und ihre Übertragbarkeit auf lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) untersucht. Es ergaben sich Hinweise, dass funktionelle Untersuchungen an primären Zellen nicht auf das Verhalten von lymphoblastoiden Zelllinien zu übertragen sind.

2008 erschien ein **Sonderheft des Fachjournals Mutagenesis** (Vol 23, No. 3.) zum Thema COMET-Assay. Dieses beinhaltet Reviews und Übersichtsartikel unter anderem zur Rolle des Assays bei Studien zu Ernährung und Krebs (Wasson 2008), zu statistischen Aspekten des Assays (Lovel und Omori 2008), zur potentiellen Rolle im Rahmen des klinischen Krebsmanagements (McKenna 2008) oder von Gene-Umwelt-Interaktionen im Rahmen des humanen Biomonitoring (Dusinka und Collins 2008).

2006 publizierten Wu et al. Schätzungen der **Heritabilität von mutagen Sensitivitäten** aus einer amerikanischen Zwillingsstudie. Sie geben eine Heritabilität von 62.7% für  $\gamma$ -Bestrahlung an (Wu 2006).

Mehrere neu erschienene Artikel beschäftigen sich mit der Verteilung (Kendall et al. 2006), den Auswirkungen auf die Sterblichkeit (Germanskaia 2006, Körblein 2006) oder auf die Struktur der DNA (Mohammadi 2006, Premi 2007) von **natürlicher Hintergrundstrahlung**. Diese Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in der Diskussion berücksichtigt.

### ***III.9 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen***

Derzeit sind vier aus dem FE-Vorhaben hervorgehende gemeinsame Publikationen mit dem BfS geplant. Deren Arbeitstitel lauten:

- Strahlenempfindlichkeit ohne Bestrahlung: Der COMET-Assay und die Messung des Basisschadens.
- Heritabilität von Strahlungsschäden an der DNA und deren molekulare Reparatur
- Adäquate Nutzung einer humanen Referenz im Monitoring von COMET-Assays: Methodische Aspekte.
- Genetik und Schädigung der DNA durch Bestrahlung bei Lungenkrebs

## **IV. Erfolgskontrollbericht : FuE Vorhaben StSch 4454**

„Untersuchung zu genetischen Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit in Lungenkrebsfamilien“

### **IV.1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms**

Kenntnisse über individuelle Strahlenempfindlichkeit und Heritabilität 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. Eine hohe Heritabilität von *in vitro* Strahlenempfindlichkeit und Basisschaden konnte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Genotypisierungen lassen jedoch keine eindeutigen Schlüsse auf genetische Marker für Strahlenempfindlichkeit zu.

Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen lassen erahnen, dass die Beteiligung von Genen nicht allein auf der Funktion bei der DNA Reparatur beruht, sondern auch mit anderen, unabhängigen Mechanismen wie Regulation der Zellzyklusprogression und Apoptose verknüpft ist und damit einen hoch komplexen und bisher nicht aufgeschlüsselten Vorgang darstellt.

### **IV.2 Wissenschaftliche Ergebnisse und wesentliche Erfahrungen des Vorhabens**

#### **IV.2.1. Bioprobenbank LCL**

Beim Aufbau der Bioprobenbank aus lymphoblastoiden Zelllinien konnte die Erfahrung gemacht werden, das sich eingefrorenen primäre Lymphozyten bei einer Zellzahl von ca. 2 Millionen Zellen pro ml gut mit dem Epstein-barr-virus (EBV) infizieren lassen. Da die primären Lymphozyten für funktionelle Untersuchungen das wertvollere Material darstellen, ist in Zukunft eine Isolation und Aufbewahrung dieser in mehreren Aliquoten anzuraten.

#### **IV.2.2. Interne Validierung der Zielgrößen des COMET-Assay**

Die gemessenen Zielgrößen wurden auf interne Validität geprüft. Einige endogene, die Messungen beeinflussenden Faktoren wurden identifiziert. Die Messwerte wurden vor der statistischen Auswertung entsprechend aufbereitet.

#### **IV.2.3. Genotypisierungen von Kandidatengen für Strahlenempfindlichkeit**

Die Ergebnisse der Genotypisierungen in Genen, die für die DNA-Reparatur relevant sind, lassen keine eindeutigen Schlüsse auf genetische Marker für Strahlenempfindlichkeit zu (siehe Ergebnisse). Eine Erweiterung der Genotypisierungen auf einen genomweitem Maßstab, sowie Untersuchungen von epigenetischen Modifikationen, der Genexpression und der metabolischen Komponenten (Metabolomics) könnten hilfreich sein, um die genetischen Varianten, die hinter dem starken Effekt der Heritabilität stehen, zu identifizieren (systembiologischer Ansatz) bzw eine mögliche Kombination verschiedener Genvarianten/ Gene aufzudecken.

### ***IV.3 Erfindungs-/Schutzanmeldungen, 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 Forschungsanträge genutzt. Hierbei sollte vor allem eine Vergrößerung des Patientenkollektivs angestrebt werden und die Untersuchungen sollten auf den genomweiten Level ausgedehnt werden.

### ***IV.4 Arbeiten, die zu keinen Lösungen geführt haben***

Alle im Antrag enthaltenen Fragestellungen wurden beantwortet. Es gab keine Arbeiten, die nicht zu einem Ergebnis geführt hätten.

### ***IV.5 Präsentationsmöglichkeiten***

Die erhobenen Befunde werden sowohl auf internationalen Fachkongressen als auch durch Publikationen in geeigneten Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Ergebnisse werden zudem von den verantwortlichen Projektteilnehmern beim BfS vorgestellt und in den gewünschten Formaten übergeben.

Erste vorläufige Ergebnisse wurden bereits von Mitarbeitern des BfS als Poster auf Fachtagungen präsentiert.

### ***IV.6 Einhaltung der Ausgaben und Zeitplanung***

#### **IV.6.1. Zeitplan**

Der angestrebte Zeitplan wurde gemäß Antrag eingehalten. Die Verlängerung des Projektes um 3 Monate diente einer Ausdehnung der SNP-Genotypisierung und einer Erweiterung der LCL Datenbank. Nachdem die Genotypisierung der Familien abgeschlossen war, ergaben sich zudem interessante Ergebnisse bezüglich des Polymorphismus XRCC1-280A. Untersuchungen am BfS zeigten eine signifikante Reduktion der DNA-Reparaturkapazität bei homozygoten Trägern des XRCC1-280A Allels. Dieser Polymorphismus war aufgrund seiner niedrigen Frequenz nicht Bestandteil des ursprünglichen SNP-Panels. Die Ermittlung weiterer homozygoter Träger im LUCY-Kollektiv war aber nach diesen neuen Erkenntnissen von großem wissenschaftlichem Interesse, was zu der Beantragung einer Verlängerung des Projektes führte. Da im Hochdurchsatz genotypisiert wurde und die Genotypisierung eines einzelnen Polymorphismus ökonomisch betrachtet nicht empfehlenswert war, wurden aus der Literatur weitere interessante Gene aus unterschiedlichen Pathways, die in Zusammenhang mit Strahlenempfindlichkeit diskutiert wurden, in Zusammenarbeit mit dem BfS, ausgewählt.

#### **IV.6.2. Finanzplan**

Die beantragten Personal- und Verbrauchsmittel wurden gemäß Antrag verbraucht.

## V. Literatur

- Aka P, Marteuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res.* 2004 Nov 22;556(1-2):169-81
- Allwright SPA, Colgan PA, Mcaulay IR, Mullins E. Natural Background-Radiation and Cancer Mortality in the Republic-Of-Ireland. *International Journal of Epidemiology* 1983; 12: 414-418.
- Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Makridou A, Wang Y, Mills G, Doheny K, Tsai YY, Chen WV, Shete S, Spitz MR, Houlston RS. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics* 2008 40(5):616-22
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 2003;69:127-35.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, Herskindb C, Havilandc J, Owend R, Janis Homewoodc J, Blissc J, Yarnolde J. TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiotherapy and Oncology* 75 ; 2005; 18-21
- Angele S, Romestaing P, Moullan N, et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Research* 2003; 63:8717-25
- Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421:499-506.
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ; Haploview: analysis and visualisation of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 2005
- Barwell J, Pangon L, Hodgson S, Georgiou A, Kesterton I, Slade T, Taylor M, Payne SJ, Brinkman H, Smythe J, Sebire NJ, Solomon E, Docherty Z, Camplejohn R, Homfray T, Morris JR. Biallelic mutation of MSH2 in primary human cells is associated with sensitivity to irradiation and altered RAD51 foci kinetics. *J Med Genet.* 2007 Aug;44(8):516-20.
- Beir VI: Health effects of exposure to radon (1999) National Academy Press, Washington, DC
- Benusiglio PR, Lesueur F, Luccarini C, Mcintosh J, Luben RN, Smith P, Dunning A, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD. Common variation in EMSY and risk of breast and ovarian cancer: a case-control study using HapMap tagging-SNPs. *Am J Hum Genet.* 2005 Mar;76(3):387-98.
- BfS 2007: Unterrichtung durch die Bundesregierung, Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung im Jahr 2007
- Bickeböller H, Fischer Ch. Einführung in die Genetische Epidemiologie. Berlin, Springer-Verlag, 2007 (ISBN: 978-3-540-25616-8)
- Boffetta P, Trichopoulos D. Cancer of the lung, larynx, and pleura. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, editors. Text book of cancer epidemiology. New York: Oxford University Press; 2002; 248-80
- Bürkle, A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *Bioessays*; 2001; 23, 795-806.
- Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996;148:1671-1678
- Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Ambrosone CB. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2005; 1;11(13):4802-9
- Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med.* 2003; 3(7):589-96.
- Chiarugi, A. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol Sci*, 2002; 23, 122-129.
- Christmann, M., Tomacic, M.T., Roos, W.P. and Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, 2003; 193, 3-34. Collis SJ, Dewese TL, Jeggo PA, Parker AR. The life and death of DNA-PK. *Onco-gene.* 2005 Feb 3;24(6):949-61
- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, Falk R, Forastiere F, Hakama M, Heid I, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Mäkeläinen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruano-Ravina A, Ruosteenoja E, Rosario AS, Tirmarche M, Tomásek L, Whitley E, Wichmann HE, Doll R. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies *BMJ* 2005; 29;330(7485):223
- De Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet.* 2005 Nov;37(11):1217-1223
- De Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1388-1402.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Mor-Their R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L, Thierens H. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and hOGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 15;62(4):1140-9
- Delia D, Piane M, Buscemi G, Savio C, Palmeri S, Lulli P, Carlessi L, Fontanella E, Chessa L. MRE11 mutations and im-paired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet.* 2004 13(18):2155-63
- Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:2610-5.
- Falconer, D.S. und Mackay, T.F.C. (1996). Introduction to quantitative genetics. Harlow: Longman Scientific & Technical
- Fernandez G.C.J. und Miller J.C. (1985). Estimation of heritability by parent-offspring regression, *Theor. Appl. Genet* 70: 650-654
- Field JK, Kiaris H, Howard P, Vaughan ED, Spandidos DA, Jones AS. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* ,1995, 71:1065-1069

- Field JK, Kiaris H, Howard P, Vaughan ED, Spandidos DA, Jones AS. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* ,1995, 71:1065–1066
- Fu YP, Yu JC, Cheng TC, Lou MA, Hsu GC, Wu CY, Chen ST, Wu HS, Wu PE, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res*. 2003 May 15;63(10):2440-6
- Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, Davis-Son L, Ferrini R, Stamato T, Orkin SH, Greenberg ME, Alt FW. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* 1998 Dec 23;95(7):891-902
- Germanskaia AA. Natural background radioactive carbon and the natural death rate of people. *Rejuvenation Res* 2006; 9: 302-308.
- Gomolka M, Rössler U, Hornhardt S, Walsh L, Panzer W, Schmid E. Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV X rays (mammography X rays) relative to 220 kV X rays and gamma rays. *Radiat Res*. 2005, 163(5):510-9.
- Gros, L., Saparbaev, M.K. and Laval, J. Enzymology of the repair of free radicals induced DNA damage. *Oncogene* 2002, 21, 8905-8925.
- Hamid AA, Mandai M, Konishi I, Nanbu K, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, Kita M, Fujii S. Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma. *Cancer* 2002, 94:997–1005
- Hanawalt, P.C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 2002, 21, 8949-8956.
- Hedges L.V., Olkin I. *Statistical Methods for Meta-Analysis*. Academic Press, New York, 1985
- Heid IM, Lamina C, Küchenhoff H, Fischer G, Klopp N, Kolz M, Grallert H, Vollmert C, Wagner S, Huth C, Müller J, Müller M, Hunt SC, Peters A, Paulweber B, Wichmann HE, Kronenberg F, Illig T. Estimating the single nucleotide polymorphism genotype misclassification from routine double measurements in a large epidemiologic sample. *Am J Epidemiol*. 2008 168(8):878-89
- Heikkinen K, Karppinen SM, Soini Y, Makinen M, Winqvist R. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *J Med Genet*. 2003 Dec;40(12):e131
- Hoeijmakers, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001, 411, 366-374.
- Hoffmann H, Högel J and Speit G The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2005 20(6):455-466.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005 Nov 15;162(10):925-42
- Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chen C, Goodman G, Field JK, Liloglou T, Xiraniarios G, Cassidy A, McLaughlin J, Liu G, Narod S, Krokkan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Martinez C, Bingham S, Rasmuson T, Hainaut P, Riboli E, Ahrens W, Benhamou S, Lagiou P, Trichopoulos D, Holcátová I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Macfarlane G, Talamini R, Simonato L, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008, 452(7187):633-7
- Hyun JW, Cheon GJ, Kim HS, Lee YS, Choi EY, Yoon BH, Kim JS, Chung MH. Radiation sensitivity depends on hOGG1 activity status in human leukemia cell lines. *Free Radic Biol Med*. 2002 Feb 1;32(3):212-20
- International Agency of Research on Cancer. *Ionizing radiation, Part 1: X- and gamma radiation, and neutrons. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Lyon: IARC 2000; p. 1–448
- Ke X, Miretti MM, Broxholme J, Hunt S, Beck S, Bentley DR, Deloukas P, CARDON LR. A comparison of tagging methods and their tagging space. *Hum Mol Genet*. 2005 Sep 15;14(18):2757-67
- Kendall GM, Hughes JS, Oatway WB, Jones AL. Variations in radiation exposures of adults and children in the UK. *Journal of Radiological Protection* 2006; 26: 257-276.
- Khoury M.J., Beaty T.H. und Cohen B.H. (1993). *Fundamentals of Genetic Epidemiology*. Oxford University Press
- Knapp M. The transmission/disequilibrium test and parental genotype reconstruction: the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1999, 64:861-870
- Kraus, W.L. and Lis, J.T. PARP goes transcription. *Cell* 2003, 113, 677-683.
- Kreuzer M, Kreienbrock L, Gerken M, Heinrich J, Bruske-Hohlfeld I, Muller M and Wichmann HE. (1999) Risk Factors for Lung Cancer in Young Adults. *American Journal of Epidemiology* 147 (11)
- Kreuzer M, Pohlmann H, Ahrens W, Kreienbrock L, Bruske-Hohlfeld I, Jockel KH, Wichmann HE. Occupational risk factors for lung cancer among young men. *Scand J Work Environ Health* 1999 Oct;25(5):422-9
- Kumaravel TS und Jha AN, Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res*. 2006 Jun 16;605(1-2):7-16.
- Laird NM, Horvath S and Xu X (2000) Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genetic Epidemiol* 19(Suppl 1): S36-S42.
- Lan Q, Shen M, Berndt SI, Bonner MR, He X, Yeager M, Welch R, Keohavong P, Dona-Hue M, Hainaut P, Chanock S. Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*. 2005 Sep;49(3):317-23
- Le Marchand L, Donlon T, Lum-Jones A, Sei-Fried A, Wilkens LR. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Apr;11(4):409-12
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *Immunity*. 2004 Aug-Sep;20(2):217-26
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, Fossa SD, Haldorsent T, Langmarg F, Brogger A, De La Chapelle A, Borresen AL (1993) Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849–5852
- Loveless D.P. und Omori, T. Statistical issues in the use of the COMET assay. *Mutagenesis* 2008 23:171-182.

- Lunetta KL, Farone SV, Biederman J, and Laird NM (2000) Family based tests of association and linkage using unaffected sibs, covariates and interactions. *Amer J Hum Gen* 66: 605-614.
- Marra G, Chang CL, Laghi LA, Chauhan DP, Young D, Boland CR (1996) Expression of human MutS homolog 2 (hMSH2) protein in resting and proliferating cells. *Oncogene* 13:2189-2196
- Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
- Medina PP, Ahrendt SA, Pollan M, Fernandez P, Sidransky D, Sanchez-Cespedes M. Screening of homologous recombination gene polymorphisms in lung cancer patients reveals an association of the NBS1-185Gln variant and p53 gene mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Aug;12(8):699-704
- Mohammadi S, Taghavi-Dehaghani M, Gharaati MR, Masoomi R, Ghiassi-Nejad M. Adaptive response of blood lymphocytes of inhabitants residing in high background radiation areas of Ramsar- micronuclei, apoptosis and COMET assays. *J Radiat Res (Tokyo).* 2006 Nov;47(3-4) 279-85.
- Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H., The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000, 10:1005-15.
- Mueller JC, Lohmussar E, Magi R, Remm M, Bettecken T, Lichtner P, Biskup S, Illig T, Pfeufer A, Luedemann J, Schreiber S, Pramstaller P, Pichler I, Romeo G, Gaddi A, Testa A, Wichmann HE, Metspalu A, Meitinger T. Linkage disequilibrium patterns and tag SNP transferability among European populations.
- Muller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002, 20:102-109
- Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 1986, 73:320-326
- Neuhäuser M. Exact tests for the analysis of casecontrol studies of genetic markers, *Hum Hered* 2002, 54:151-156
- O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Genery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell.* 2001 8(6):1175-85
- O'Malley Y, Zhao W, Barcellos-Hoff MH, et al. Radiation-induced alterations in rat mesangial cell Tgfb1 and Tgfb3 gene expression are not associated with altered secretion of active Tgfb isoforms. *Radiat Res* 1999;152:622-628.
- Park J, Chen L, Tockman MS, Elahi A, Lazarus P. The human 8-oxoguanine DNA N glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. *Pharmacogenetics.* 2004;14(2):103-9.
- Paull TT, Gellert M. A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(12):6409-14.
- Petitti, D.B. (2000). Meta-analysis, decision analysis, and cost-effectiveness analysis methods for quantitative synthesis in medicine. New York: Oxford University Press.
- Popanda O, Schattenberg T, Phong CT, Butkiewicz D, Risch A, Edler L, Kayser K, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Bartsch H, Schmezer P. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004, 25(12):2433-41
- Premi S, Srivastava J, Chandy SP, Ali S. AZFc somatic microdeletions and copy number polymorphism of the DAZ genes in human males exposed to natural background radiation. *Hum Genet.* 2007 May;121(3-4) 337-46.
- Quarumby S, Fakhoury H, Levine E, et al. Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 2003;79:137-43.
- Quinn AG, Healy E, Rehman I, Sikkink S, Rees JL. Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 1995; 104:309-312
- Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996; 98:601-607
- Roberts S A, Spreadborough A. R., Bulman B., Barber JBP, Evans DGR and Scott D. Heritability of Cellular Radiosensitivity: A Marker of Low-Penetrance Predisposition Genes in Breast Cancer? *American Journal of Human Genetics* 1999; 65:784-794, 784
- Roddam PL, Rollinson S, O'Driscoll M, Jeggo PA, Jack A, Morgan GJ. Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. *J Med Genet.* 2002 Dec;39(12):900-5
- Rosenberger A, Illig T, Korb K, Klopp N, Zietemann V, Woelke G, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Cebulla M, Degen M, Drings P, Groeschel A, Konietzko N, Kreymborg K, Haeuszlinger K, Hoeffken G, Jilge B, Ko YD, Morr H, Schmidt C, Taescher D, Bickeboeller H, Wichmann HE. Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years *BMC Cancer* 2008 25; 8:60
- Rosenberger A, Illig T, Korb K, Klopp N, Zietemann V, Woelke G, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Cebulla M, Degen M, Drings P, Groeschel A, Konietzko N, Kreymborg K, Haeuszlinger K, Hoeffken G, Jilge B, Ko YD, Morr H, Schmidt C, Taescher D, Bickeboeller H, Wichmann HE. (2008) Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years *BMC Cancer* 25; 8:60
- Sakiyama T, Kohno T, Mimaki S, Ohta T, Yanagitani N, Sobue T, Kunitoh H, Saito R, Shimizu K, Hiramata C, Kimura J, Maeno G, Hirose H, Eguchi T, Saito D, Ohki M, Yokota J. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. *Int J Cancer.* 2005 May 1;114(5):730-7.
- Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, Kropp S, Mittelstrass K, Timofeeva M, Wölke G, Steinwachs A, Scheiner D, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Dienemann H, The LUCY-Consortium, Chang-Claude J, Illig T, Wichmann, H-E, Bickeböller H and Risch A. Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) Is Associated with Early Onset Lung Cancer. *Cancer Biomarkers and Prevention* 2008; 17(5)
- Schärer O.D. Chemie und Biologie der DNA-Reparatur, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003; 42(26):2946-74.
- Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N. and Helleday, T. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2003, 31, 4959-4964.
- Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer *Cytogenetic and Genome Research* 2004, 104:365-370
- Seeberg, E., Eide, L. and Bjoras, M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 1995, 20, 391-397.
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003 3:155-68.

- Soldani, C. and Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 2002, 7, 321-328.
- Taylor AM, Byrd PJ. Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 2005 58:1009-15.
- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsäter A, Flex A, Aben KK, de Veigt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeneý LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfingsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008, 452(7187):638-42
- Tischfield JA, & Shao C. Somatic recombination redux *Nature Genetics* 2003, 33:5 - 6
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):21447-50.
- Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 2003 Sep 1;22(37):5792-812.
- Wakeford R. The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene* 2004, 23:6404-28
- Wang J, Robbins ME. Radiation-induced alteration of rat mesangial cell transforming growth factorbeta and expression of the genes associated with the extracellular matrix. *Radiat Res* 1996; 146:561-568.
- Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS., The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*. 2008, 23(3):153-62
- Watanabe M, Imai H, Kato H, Shiraiishi T, Ushijima T, Nagao M, Yatani R. Microsatellite instability in latent prostate cancers. *Int J Cancer* 1996, 69:394-397
- Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev* 1998; 12:2445-2462.
- Wichmann HE, Schaffrath Rosario A, Heid IM, Kreuzer M, Heinrich J, Kreienbrock L. Increased lung cancer risk due to residential radon in a pooled and extended analysis of studies in Germany. *Health Physics* 2005, 88, 71-79
- Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer*. 2000 Dec 15;88(6):932-7.
- Wu X, Spitz MR, Amos CI, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz NL, Shields PG and Swa GE. Mutagen Sensitivity Has High Heritability: Evidence from a Twin Study. *Cancer Research* 2006, 66(12):5993-6
- Yang H, Spitz MR, Stewart DJ, Lu C, Gorlov IP, Wu X. ATM sequence variants associate with susceptibility to non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2007 Nov 15;121(10):2254-9.
- Young, L.C., Hays, J.B., Tron, V.A. and Andrew, S.E. DNA mismatch repair proteins: potential guardians against genomic instability and tumorigenesis induced by ultraviolet photoproducts. *J Invest Dermatol* 2003, 121, 435-440.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002, 297, 259-263.
- Ziegler, M. and Oei, S.L. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioassays* 2001, 23, 543-548



# | 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](http://www.bfs.de)

E-Mail: [ePost@bfs.de](mailto:ePost@bfs.de)

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



**Bundesamt für Strahlenschutz**