

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Vergleichende Analyse molekularer Parameter, die zelluläre und
klinische Strahlenüberempfindlichkeit verursachen –
Vorhaben 3604S04439**

**Auftragnehmer:
Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena**

E. Fritz

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-23/09

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2009100625

Salzgitter, November 2009

Schlussbericht

FuE Vorhaben StSch 4439

Thema:

Vergleichende Analyse zellulärer und molekularer Parameter, die klinische Strahlenempfindlichkeit verursachen (Folgeprojekt von StSch 4360)

Laufzeit:

01.02.2005 bis 30.06.2008

Forschungsnehmer:

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

In Kooperation mit:

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

Dr. H. Braselmann
Helmholz-Zentrum München, Institut für Molekulare Strahlenbiologie

Klinisch/epidemiologische Partner:

Prof. Dr. E. Wichmann
Helmholz-Zentrum München, Institut für Epidemiologie

Prof. Dr. E. Holler
Klinikum der Universität Regensburg, Abt. Hämatologie/Intern. Onkologie

Prof. Dr. H.-J. Kolb
GSF-Hämatologikum, Med. Klinik III, Großhadern, München

Teil I: Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Ziel des vorliegenden Projektes war es, zelluläre und molekulare Parameter der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu charakterisieren.

Basierend auf dem Vorläuferprojekt StrSch4360 („Multiparametrische Erfassung von Strahlenwirkungen zur Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit“) sollte die Anzahl untersuchter Zellproben von Patienten und unauffälligen Kontrollen aus 3 Kohorten auf 100 erhöht werden. Weiterhin sollten mittels statistischer Analysen strahlenauffällige Proben innerhalb der Kohorten erkannt und weiter charakterisiert werden. Zu diesem Zweck war eine Immortalisierung des primären Zellmaterials erforderlich. Resultierende Zelllinien sollten auf molekulare Veränderungen von Proteinen bzw. den entsprechenden Genen getestet werden, die als Kandidaten für Strahlenempfindlichkeit bekannt sind.

2. Voraussetzungen

Das FLI (früher IMB) hat alle benötigten wissenschaftlichen Methoden und Geräte zur Durchführung des Projekts zur Verfügung. Durch die Kooperation mit der AG Eckardt-Schupp wurde auf die bewährte strahlenbiologische Kompetenz des Instituts für Strahlenbiologie im Helmholtz Zentrum München (früher: GSF) zurückgegriffen. Die AG Eckardt-Schupp führte die experimentellen Arbeiten dafür als Unterauftragnehmer des FLI durch.

3. Planung und Ablauf

Die Durchführung wurde ursprünglich für verschiedene Phasen konzipiert, die z.T. auf den Arbeiten des Vorläuferprojekts basieren:

Phase 1: Ergänzung der im Vorläuferprojekt untersuchten Kohorten und Definition von strahlenauffälligen Proben

Primäre periphere Lymphozyten wurden von Patienten und unauffälligen Spendern von 3 verschiedenen Kohorten isoliert und bzgl. strahleninduzierter Apoptose (AnnexinV-Assay) und DNA-Reparatur nach Bestrahlung (Comet-Assay) getestet. Die Kohorten bestanden aus jungen Lungentumorpatienten („LUCY“), unauffälligen bevölkerungs-basierten Kontrollen („KORA“) und Leukämiepatienten. Diese Phase war aufgrund mehrerer Verzögerungen in der Lieferung des Zellmaterials mehrfach verlängert worden. Bezüglich der Kohorte der Leukämiepatienten wurde mit dem BfS abgestimmt, dass aufgrund der erschwerten Rekrutierbarkeit die Gesamtzahl von 100 individuellen Proben nicht erreicht werden kann und die Auswahl, Immortalisierung und weitere molekulare Charakterisierung auffälliger Proben hier entfällt.

Phase 1b: Immortalisierung strahlenauffälligen Proben

Die Gesamtauswertung der phänotypischen Daten der gesamten Kohorten wurde von einem Biostatistiker (H. Braselmann, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Da die Comet-Daten geringere Abweichungen innerhalb der Kohorten aufwiesen und erst verspätet auswertbar waren, wurde zur Auswahl strahlenauffälliger Proben zunächst das Kriterium der strahleninduzierten Apoptose verwendet. Es konnten in Kooperation mit dem Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München 22 immortalisierte Zelllinien hergestellt werden.

Phase 2: Biochemische Analyse von Kandidatenproteinen der Strahlenempfindlichkeit

Nach erfolgreicher Immortalisierung auffälliger Proben wurden Proteinextrakte der Zelllinien angefertigt. Die Analyse geeigneter Kandidatenproteine in Western Blots erbrachte keine klaren Aussagen bzgl. einer Defizienz, Haploinsuffizienz oder Fragmentierung der Proteine.

Phase 2b: Funktionelle Analyse von XRCC1

In Voruntersuchungen anderer Gruppen war in Trägern eines SNP im XRCC1-Gen eine reduzierte DNA-Reparatur-Kapazität bei LUCY-Probanden im Comet Assay festgestellt worden. Diese reduzierte DNA-Reparatur konnte in mehreren immortalisierten Zelllinien, die diesen SNP homozygot oder heterozygot tragen, nicht funktionell bestätigt werden.

Phase 3: Molekular-genetische Analyse von Kandidatengenen der Strahlenempfindlichkeit

Die Sequenzierung von Kandidatengenen stellte sich als sensitives Mittel heraus, genetische Veränderungen in den Kandidatengenen der auffälligen Proben zu entdecken. So wurden neben mehreren bereits bekannten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) in cDNAs einzelner Probanden neue Nukleotid-Mutationen (vermutlich individuelle Mutationen), und Spleiß-bedingte Exon-Veränderungen gefunden, die homozygot oder heterozygot aufgetreten waren.

Phase 4: Gesamtauswertung und Erstellung des Abschlussberichts

Die Gesamtauswertung ergab, dass schwache Korrelationen zwischen manchen SNPs in Kandidatengenen der Strahlenempfindlichkeit auftraten, deren statistische Signifikanz aufgrund der geringen Probenzahl jedoch nicht ermittelt werden kann. Eine funktionelle Korrelation der genetischen Veränderungen mit dem Phänotyp kann in nachfolgenden Studien gezielt angegangen werden.

4. Wissenschaftlicher Stand

Es waren bisher keine allgemeingültigen Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit bekannt. Im vorliegenden Projekt konnte die strahleninduzierte Apoptose als brauchbarer Marker verwendet werden, unter dem Vorbehalt dass auch hier die statistische Signifikanz fraglich bleibt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Studie wurde in Kooperation mit mehreren Instituten des Helmholtz Zentrum München durchgeführt: Institut für Strahlenbiologie, Institut für Molekulare Strahlenbiologie, Institut für Epidemiologie.

Weiterhin waren 2 Kliniken beteiligt: Universitätsklinikum Regensburg und Klinikum der LMU München.

Innerhalb des Leibniz-Instituts für Altersforschung wurde die Sequenzanalyse über eine Kooperation mit der Forschungsgruppe Platzer durchgeführt.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. des erzielten Ergebnisses

(siehe beiliegenden Ergebnisbericht, ab Seite 5)

2. des voraussichtlichen Nutzens, der Verwertbarkeit:

Die in dieser Studie erlangten Ergebnisse können zur weiteren Analyse der individuellen Strahlenempfindlichkeit neue Ansatzpunkte bringen. Insbesondere die neu gefundenen Mutationen in Kandidatengenenen der Strahlenempfindlichkeit legen es nahe, in weiteren funktionellen Studien deren Bedeutung für die individuelle Strahlenempfindlichkeit, aber auch für die Tumorigenese weiter zu verfolgen. Die schwache Korrelation, die für manche SNPs mit der Strahlenempfindlichkeit (Apoptose) entdeckt wurde, sollte in größer angelegten SNP-Analysen weiterverfolgt werden.

3. des während der Durchführung bekannt gewordenen Fortschritts

Das Erfassen der individuellen Strahlenempfindlichkeit auf zellulärer Ebene erfordert i. d. R. die Immortalisierung des Zellmaterials. Die EBV-Immortalisierung von Lymphozyten hat jedoch schwerwiegende Veränderungen in der Zellregulation zur Folge, so dass die immortalisierten Zellen bezüglich Strahlen-relevanter Phänotypen (Apoptose, Zellzyklus, etc.) nicht mehr den primären Zellen entsprechen. Der Einfluss viraler EBV-Proteine auf zelluläre Zielproteine wurde vor kurzem publiziert. In einer parallelen, BfS-finanzierten Studie (StSch4467) wurden gezielt primäre und daraus abgeleitete EBV-immortalisierte Zellen bzgl. Strahlenempfindlichkeit (Apoptose, H2A-X-Phosphorylierung) untersucht. Es zeigt sich hier eindeutig, dass die immortalisierten Zellen phänotypisch bzgl. Strahlenempfindlichkeit nicht mehr den primären Vorläuferzellen entsprechen. Vor diesem Hintergrund erscheint es künftig nicht ratsam, immortalisierte Derivate mit Hilfe funktioneller Assays und Analysen der Proteinexpression zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit zu verwenden.

Davon unbeeinflusst sollten genetische Determinanten der Strahlenempfindlichkeit auch in den EBV-Zellen unverändert vorliegen und somit analysierbar sein. Unabhängig davon ist die Analyse genetischer Veränderungen auch mit dem geringen Ausgangsmaterial primärer Zellen prinzipiell möglich.

4. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen

geplant:

- Genetic polymorphisms in radiosensitivity genes correlating to clinical radiosensitivity: a case study
- Novel mutations in ATM and PALB-2 and their implication in radiosensitivity

Teil III: Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses:

Die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse zielen unmittelbar auf den Schutz der Bevölkerung vor unnötig hoher Strahlenbelastung. Es wurde die Frage gestellt, wie individuelle Strahlenempfindlichkeit detektierbar ist, um die klinische Krebstherapie effizienter und mit weniger Nebenwirkungen individuell gestalten zu können.

Ein zweiter Aspekt betrifft die Analyse von Kandidatengenomen der Strahlenempfindlichkeit. Sollten hier genetische Variationen mit Strahlenempfindlichkeit in größer angelegten Studien verifiziert werden, ist durch genetische Tests prinzipiell ein prädiktiver Schutz der allgemeinen Bevölkerung vor erhöhter Strahlenbelastung, z.B. im Arbeitsumfeld, möglich.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis:

Wie im Schlussbericht formuliert, konnten leichte Korrelationen bestimmter SNPs mit Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen primären Patientenzellen entdeckt werden. Neue Mutationen in Kandidatengenomen der Strahlenempfindlichkeit wurden entdeckt, die weitere funktionelle Analysen nach sich ziehen werden. Für Details siehe bitte den detaillierten Ergebnisbericht.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans:

Die Ergebnisse werden in Fachpublikationen der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt. Eine finanzielle oder patentrechtliche Verwertung der Ergebnisse steht nicht an.

4. Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben:

Die Analyse der strahlen-induzierten Apoptose in EBV-immortalisierten Zelllinien war methodisch nicht durchführbar. Analoge Ergebnisse wurden in einer parallelen Studie (StSch 4467) erzielt. Für Details siehe bitte den detaillierten Ergebnisbericht dieses Projektes und von StSch 4467.

5. Präsentationsmöglichkeiten:

(entfällt)

6. Einhaltung der Zeit- und Ausgabenplanung:

Die Ausgabenplanung konnte im Wesentlichen eingehalten werden.

Die Zeitplanung war in der Hauptsache durch Personalveränderungen mehrfach verändert, bzw. verlängert worden. Die hohe Fluktuationsrate wissenschaftlichen Personals in der Grundlagenforschung ist mit der administrativ langwierigen Zeitplanung der Projekte oft nicht vereinbar. Ein weiterer Verzögerungsfaktor trat projekt-spezifisch auf: Die Kooperation mit klinischen Partnern, insbesondere die Rekrutierung biologischen Materials aus kooperierenden Kliniken, verbunden mit aufwändigen Antragsverfahren für ein Ethik-Votum, war mehrfach mit größeren, vom Projektleiter nicht zu verantwortenden Verzögerungen verbunden.

zu Teil II: Eingehende Darstellung: Ergebnisbericht

1. <u>Untersuchungsmaterial und -Daten</u>	7
1.1. Patienten und Kontrollpersonen	7
1.2. Medizinische, biometrische und andere Daten zu den Personen	7
1.3. Kontrollzelllinien	8
1.4. Auffüllen der Anzahl analysierter Proben	8
2. <u>Strahlenempfindlichkeit von primären Zellen</u>	9
2.1. Isolierung von Lymphozyten	9
2.2. Comet-Assay	9
2.2.1. Grundlagen und Methodik	9
2.2.2. Überlegungen zur statistischen Auswertung	10
2.2.3. Durchführung	10
2.2.4. Ergebnisse und Interpretation	11
2.3. Apoptose-Assay	15
2.3.1. Grundlagen und Methodik: AnnexinV-Assay	15
2.3.2. Überlegungen zur statistischen Auswertung	16
2.3.3. Durchführung	17
2.3.4. Ergebnisse und Interpretation	18
2.4. Korrelation: Apoptose-Comet Assay	23
2.4.1. Korrelation auf Ebene der Gesamt-Kohorten	23
2.4.2. Korrelation auf Ebene der einzelnen Proben	23
3. <u>Charakterisierung immortalisierter Zelllinien</u>	24
3.1. Herstellung EBV-immortalisierter Zelllinien aus ausgewählten Patienten	24
3.1.1. Auswahlkriterien	24
3.1.2. Durchführung	24
3.1.3. Ergebnisse und Interpretation	24
3.2. Apoptose-Assay mit EBV-Zelllinien	26
3.2.1. Grundlagen und Methodik	26
3.2.2. Sub-G1-Assay	26
3.2.3. Caspase-Assay	29
3.3. Korrelation: Apoptose bei primären Zellen vs. EBV-Derivaten	32
4. <u>Molekulare Funktionsanalysen</u>	34
4.1. Funktionale Analyse des Arg210His-Polymorphismus in XRCC1	34
5. <u>Molekulare Analysen der auffälligen Proben</u>	36
5.1. Kandidatenproteine der Strahlenempfindlichkeit	36
5.1.1. Grundlagen und Methodik	36
5.1.2. p53	36
5.1.3. NBS1	38
5.1.4. TopoI	39
5.1.5. XRCC1	40
5.1.6. PALB-2	41
5.1.7. Cdc45	42
5.1.8. Chk-1	42
5.1.9. WRN	43
5.1.10. Interpretation	43
5.2. Kandidaten-Gene der Strahlenempfindlichkeit	44
5.2.1. Grundlagen und Methodik	44
5.2.2. ATM	45
5.2.3. NBS1	46
5.2.4. BLM	47
5.2.5. WRN	48
5.2.6. p53	49

5.2.7. PALB-2	50
5.2.8. TGF β -1	51
5.2.9. XRCC1	52
5.2.10. XRCC3	53
5.2.11. OGG-1	54
5.2.12. Interpretation	55
6. <u>Korrelationen</u>	56
6.1. Korrelation: molekulare Parameter - zelluläre Parameter	56
6.2. Korrelation: experimentelle Parameter – klinisch/epidemiologische Param.	56
7. <u>Zusammenfassung</u>	57
8. <u>Anhang</u>	59

1. Untersuchungsmaterial und -Daten

1.1 Patienten und Kontrollpersonen

Das vorliegende Projekt ist als Nachfolgeprojekt aus StSch4360 „Multiparametrische Erfassung von Strahlenwirkungen zur Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit“ entstanden, in welchem bereits die zu untersuchenden Kohorten definiert waren:

1.1.1 Junge Lungentumor-Patienten (LUCY-Studie, „lung cancer in the young“, Helmholtz-Zentrum München (HZM), vormals GSF): Das primäre Zellmaterial dieser Patienten konnte vom GFS-Institut für Epidemiologie bezogen werden.

1.1.2 Leukämie-Patienten: Es waren 2 Kliniken als Kooperationspartner rekrutiert worden, die Blutproben von Leukämiepatienten zur Verfügung stellten. Hierfür waren vom Projektleiter die Infrastruktur des Transports, ein entsprechendes Ethik-Votum sowie die Kommunikationsstrukturen aufgebaut worden. Einschlusskriterium für die geeigneten Patienten war, dass sie einer Ganzkörper-Bestrahlung im Rahmen der Konditionierung für die Knochenmarkstransplantation unterzogen wurden. Im Vorläuferprojekt wurden sowohl vor als auch nach der Bestrahlung Blutproben entnommen und analysiert.

1.1.3 Unauffällige Kontrollen (KORA-Studie, „Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg“): Das primäre Zellmaterial dieser Patienten stammt aus einer prospektiven, bevölkerungs-basierten Studie und konnte vom ehemaligen Institut für Epidemiologie (HZM) bezogen werden.

1.1.4 Laborkontrollen: Zusätzlich zu den Kontrollen der KORA-Studie wurden in den experimentellen Analysen Zellen aus internen Kontrollen des Laborpersonals verwendet, um eine Abschätzung der experimentellen Schwankungen der standardisiert durchgeführten Assays zu ermöglichen. In der Regel wurden für jeden Standard-Assay immer Blutzellen der gleichen Person als interner Standard verwendet.

1.2 Medizinische, biometrische und andere Daten zu den Personen

Um eine mögliche Korrelation der experimentellen Daten zu klinischen Befunden, Vorgeschichte des Patienten, biometrischen Daten o.ä. zu ermöglichen, standen verschiedene Datensätze der unterschiedlichen Patientenkollektive zu Verfügung:

- 1.2.1 Lungentumorpatienten: Personendaten, Krebshintergrund, Raucherstatus.
- 1.2.2 Leukämiepatienten: Hierfür waren Fragebögen erstellt worden, die i) allgemeine Informationen zum Patienten, dessen Familiengeschichte, Vorerkrankungen, etc. abdecken (Anhang 8.1.2), ii) den akuten klinischen Verlauf nach Bestrahlung dokumentieren (Anhang 8.1.2/1).
- 1.2.3 KORA: zusätzlich zu den unter 1.2.1 genannten Daten sind hier prinzipiell auch experimentelle Daten anderer Forschungsgruppen verfügbar, die über eine entsprechende Projektvereinbarung einsehbar werden können. Insbesondere sind an KORA-Proben auch SNP-Analysen an Genen der DNA-Reparatur und der Apoptose erhoben worden, die im Zusammenhang mit unseren hier dargestellten Daten von hohem Interesse sein sollten.
- 1.2.4 Zu den internen Laborkontrollen (unauffällige Donoren) wurden aus Datenschutz-Gründen keine zusätzlichen Daten erhoben.

1.3 Kontrollzelllinien

Zur Etablierung und Standardisierung der experimentellen Methoden wurden mehrere Kontrollzelllinien verwendet:

Tabelle 1.3: Verwendete Zelllinien

Name	Herkunft	Beschreibung (Genotyp)	Verwendet für
94P111	M. Digweed, Charite Berlin	EBV-immortalisierte Zelllinie eines obligat heterozygoten Trägers der NBS1-Gründermutation	Standardisierung Comet Assay; Etablierung der Western Blots und der Sequenzierung
94P112	M. Digweed, Charite Berlin	EBV-immortalisierte Zelllinie eines NBS-Patienten (homozygote NBS-Gründermutation)	Standardisierung Comet; Etablierung der Western Blots und der Sequenzierung
BAB626	P. Patel, Baylor College, Houston TX	EBV-immortalisierte Zelllinie eines unauffälligen Donors (Elternteil eines Smith-Magenis-Patienten)	Standardisierung Comet Assay; Etablierung der Western Blots
Reg2	(GSF-EPI)	EBV-immortalisierte Zelllinie eines Leukämiepatienten aus Regensburg	Etablierung der Western Blots und der Sequenzierung

1.4 Auffüllen der Anzahl analysierter Proben

Ein wesentliches Ziel der Studie StSch4439 war es, basierend auf den in der Vorläuferstudie StSch4360 erhobenen Materialien und Daten die Anzahl der rekrutierten und analysierten Proben jeder Kohorte auf etwa 100 zu erhöhen. Durch eine erhöhte Anzahl analysierter Proben sollte die statistische Relevanz der experimentellen Ergebnisse erhöht werden. Wie in Tabelle 2 dargestellt, konnten für die LUCY- und KORA-Kohorten viele weitere Proben rekrutiert und analysiert werden. Die angestrebte Anzahl von 100 Proben konnte bei den Leukämie-Patienten nicht erreicht werden, da i) zum einen die Anzahl Ganzkörper-bestrahlter Leukämiepatienten laut Aussagen der medizinischen Partner abnahm (Einschlusskriterium siehe 1.1.2), ii) ein medizinischer Partner aufgrund personeller Änderungen keine Kapazität mehr zur Probenentnahme, -Verschickung und -Dokumentation hatte. Konsequenterweise wurde als Änderung in der Zielsetzung zwar die möglichst weitere Rekrutierung von Proben, und eine vorläufige aber nicht abschließende Gesamtanalyse und -Statistik der Leukämiepatienten mit dem BfS vereinbart.

Tabelle 1.4: Anzahl analysierter Proben in den Kollektiven der Studien

Kohorte	Anzahl der Proben im Vorläuferprojekt 4360	Anzahl der Proben StrSch 4439	Gesamtsumme
junge Lungentumor-Patienten (LUCY)	20	76	96
Leukämie-Patienten	59	7	66
Unauffällige Kontrollen (KORA)	49	72	121

2. Strahlenempfindlichkeit von primären Zellen

2.1 Isolierung von Lymphozyten und deren Bestrahlung *in vitro*

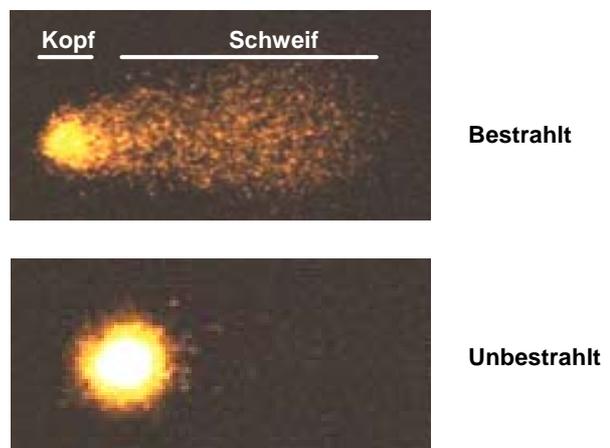
Im Vorläuferprojekt wurden die primären Lymphozyten der KORA- und LUCY-Kohorten direkt als eingefrorene Proben vom Institut für Epidemiologie bezogen; die Blutproben der Leukämiepatienten wurden mittels Ficoll-Gradienten aufgereinigt und die Lymphozyten isoliert. In der hier beschriebenen Nachfolgestudie wurden weitere Blutproben von LUCY-Patienten vom Institut für Epidemiologie bezogen; weitere KORA- und Leukämie-Proben wurden rekrutiert und die Zellen am FLI aufgereinigt. Aus dem antikoagulierten Vollblut der Patienten bzw. gesunden Kontrollpersonen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die Lymphozyten isoliert. Dabei kamen - als Neuerung im Vergleich zum Vorläuferprojekt - Leucosep-Röhrchen (Greiner) und als Separationsmedium Biocoll (Biochrom) zum Einsatz. Die frisch gewonnenen Blutproben hatten unterschiedlich lange Transportzeiten hinter sich, bevor in Jena die Lymphozyten-Isolierung erfolgen konnte: Während die Blutproben der Kontrollpersonen der KORA-Studie (nach erneuter Einbestellung) und der Leukämie-Patienten aus dem Raum Augsburg bzw. Regensburg kamen und mehrere Stunden unterwegs waren, konnte das Blut der Laborkontrolle unmittelbar nach der Blutentnahme aufgearbeitet werden.

Zur Analyse der strahleninduzierten Apoptose und DNA-Reparatur wurden die primären Zellen mit einer Cs137-Quelle (Dosisleistung 1,23 Gy/min in Jena; 0,56 Gy/min in München) bestrahlt. Für den Endpunkt Apoptose wurden 0,4 Gy und 0,8 Gy als Dosis gewählt; für den Comet-Assay und die Proteinanalysen (Western Blots) wurde i. d. R. mit 4 Gy bestrahlt.

2.2 Comet-Assay

2.2.1 Grundlagen und Methodik

Die schädigende Auswirkung ionisierender Strahlung auf die DNA von Lymphozyten wurde mit Hilfe des Comet-Assays untersucht. In der hier verwendeten Variante des alkalischen Comet-Assays lassen sich in der DNA sowohl Einzelstrangbrüche (*single strand breaks*, SSB) als auch Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*) nachweisen. Das Prinzip beruht auf einer Einzelzell-Gelelektrophorese: durch ein elektrisches Feld wird fragmentierte (geschädigte) DNA aus dem Zellkern herausgezogen und je nach dem Grad der Fragmentierung in einem mehr oder minder langen kometenartigen Schweif um die Zelle angeordnet, während ungeschädigte DNA im Zellkern („Kopf“) verbleibt. Länge und DNA-Gehalt des Schweifes im Vergleich zum Kopf hängen von der Art und Zahl der DNA-Schäden ab. Dadurch ist es möglich, DNA-Schäden auf der Ebene von Einzelzellen quantitativ zu erfassen. In der Auswertung werden für jede Zelle eine Vielzahl von Werten gemessen, darunter die Länge der Zelle (*Comet extent*), des Schweifes (*tail extent*) sowie des Kopfes (*head extent*), die Intensität der gesamten Zelle (*Comet total intensity*), die Fläche der Zelle (*Comet total area*) und der Anteil an DNA im Kopf (*head-DNA*) und im Schweif (*tail-DNA*). Aus diesen Werten wird der so genannte *Olive tail moment* (TOM) berechnet, welches der am besten geeignete



Parameter für die Quantifizierung von DNA-Schäden ist (Olive, 1990). Der TOM ist folgendermaßen definiert:

$TOM = (\text{Abstand der Hauptintensitäten von Kopf und Schweif}) \times \text{DNA-Gehalt im Schweif}$

Oder mit anderen Worten: der TOM ist das Produkt aus der mittleren Wanderungsdistanz der DNA im Schweif mit dem DNA-Gehalt im Schweif.

Als alternativer Ansatz zur Auswertung wurde auch die *tail-DNA* als Datengrundlage verwendet.

2.2.2 Überlegungen zur statistischen Auswertung

Als statistischer Endpunkt wurden die DNA-Reparaturkapazitäten (DRC) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung unter Berücksichtigung des individuellen Kontrollwertes der unbestrahlten Probe gewählt. Die Rohdaten, welche am Helmholtz Zentrum München (ehemals GSF) und am Leibniz-Institut für Altersforschung erhoben wurden waren, waren wegen unterschiedlicher Comet-Auswerte-Softwares nicht direkt kompatibel. Daher war die Berechnung der DRC-Werte essentiell notwendig, um für die Gesamt-Auswertung die DRC-Werte aller verwendeten Proben direkt vergleichen zu können.

Die DRC ist definiert als der relative reparierte Schaden zum Zeitpunkt t

$$\begin{aligned} DRC &= \frac{\text{reparierter Schaden (t)}}{\text{Initialschaden}} = \frac{(x4(0) - x0) - (x4(t) - x0)}{x4(0) - x0} \\ &= 1 - \frac{x4(t) - x0}{x4(0) - x0} \end{aligned}$$

wobei $x4(0)$, $x4(t)$ der nach Bestrahlung von 4 Gy gemessene Schaden zur Zeit 0 (Initialschaden) oder t = 15 und 60 min (reparierter Schaden) und $x0$ der individuelle Kontrollwert ohne Bestrahlung bedeutet. Der individuelle Kontrollwert $x0$ war von der Zeit unabhängig und wurde, sofern jedes Mal gemessen, über die Zeitpunkte gemittelt. Wenn er nur einmal gemessen werden konnte, dann war das i.d.R. der späteste Zeitpunkt (t=60 min). Für die „x“-Werte wurden einmal die TOM-Mediane und parallel dazu die Mediane der tail-DNA aus den jeweils 100 (2x50) analysierten Einzelzellen pro Person, Zeitpunkt und Bestrahlung verwendet. Von den Reparaturkapazitäten der mitlaufenden Standardkontrolle wurde jeweils ein unterer Schwellwert gewählt, der den ganzen Streubereich ohne Ausreißer umfasst.

2.2.3 Durchführung

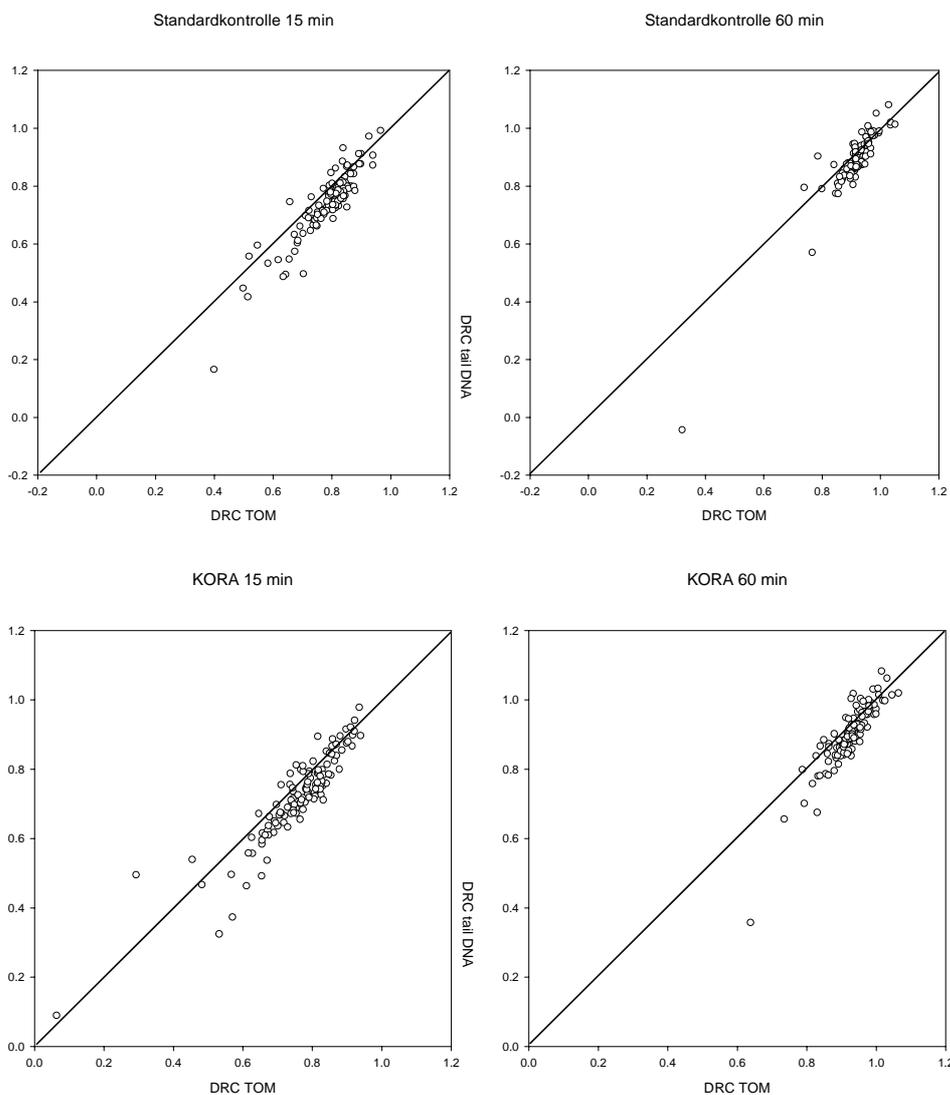
Von den KORA-Kontrollen konnten Zellen von 121 Spendern analysiert und ausgewertet werden, vom LUCY-Kollektiv 93 Proben und von den Leukämie-Patienten 64 Proben.

Prinzipiell wurde in jeder Testreihe eine interne Laborkontrolle (= Standardkontrolle) mitgeführt, um die Qualität des jeweiligen Experiments abzuschätzen. Experimente mit starker Abweichung (> 30%) zu den früheren Testergebnissen der Standardkontrolle wurden als ungültig verworfen. Die mikroskopische Auswertung wurde in diesem Projekt immer von derselben Person standardisiert durchgeführt.

Im Unterschied zum Apoptose-Assay wird der Comet-Assay nicht durch unterschiedliche Apoptoseraten in den Populationen beeinflusst. Bei der Auswertung werden aufgrund der klaren Erkennbarkeit apoptotisch zersetzter Zellkerne nur nicht-apoptotische Zellen erfasst, so dass apoptotische - nicht reparierte - Kerne nicht in die Bewertung mit eingehen. Das ausführliche Protokoll der Methodik ist im Anhang (8.223) beschrieben.

2.2.4 Ergebnisse und Interpretation

Die Auswertung wurde – entsprechend der Vorüberlegungen zur Statistik - basierend auf der Berechnung der Reparaturkapazität vorgenommen. Eine Gegenüberstellung (Abbildung 2.2.4) der berechneten DRC-Werte auf der Basis der TOM-Daten bzw. der *tail*-DNA-Daten zeigt, dass die Werte sehr gut korrelieren und in der Regel nur in Proben mit extremen DRC-Werten von der idealen Korrelation (diagonale Achse) abweichen. Betrachtet man die einzelnen Gesamt-Populationen, so liegen 15 min nach Bestrahlung die *tail*-DNA-Werte im Schnitt leicht unterhalb der entsprechenden TOM-Werte. 60 min nach Bestrahlung liegen die Werte auf der gleichen Höhe, die TOM-DRC entspricht also der *tail*-DNA-DRC in der Gesamtpopulation. Ausnahme ist hier die Leukämie-Kohorte, bei der auch nach 60 min der Hauptanteil der Proben einen etwas geringeren *tail*-DNA-Wert im Vergleich zum jeweiligen TOM-Wert zeigt. Die Ursache hierfür ist derzeit unbekannt.



A

B

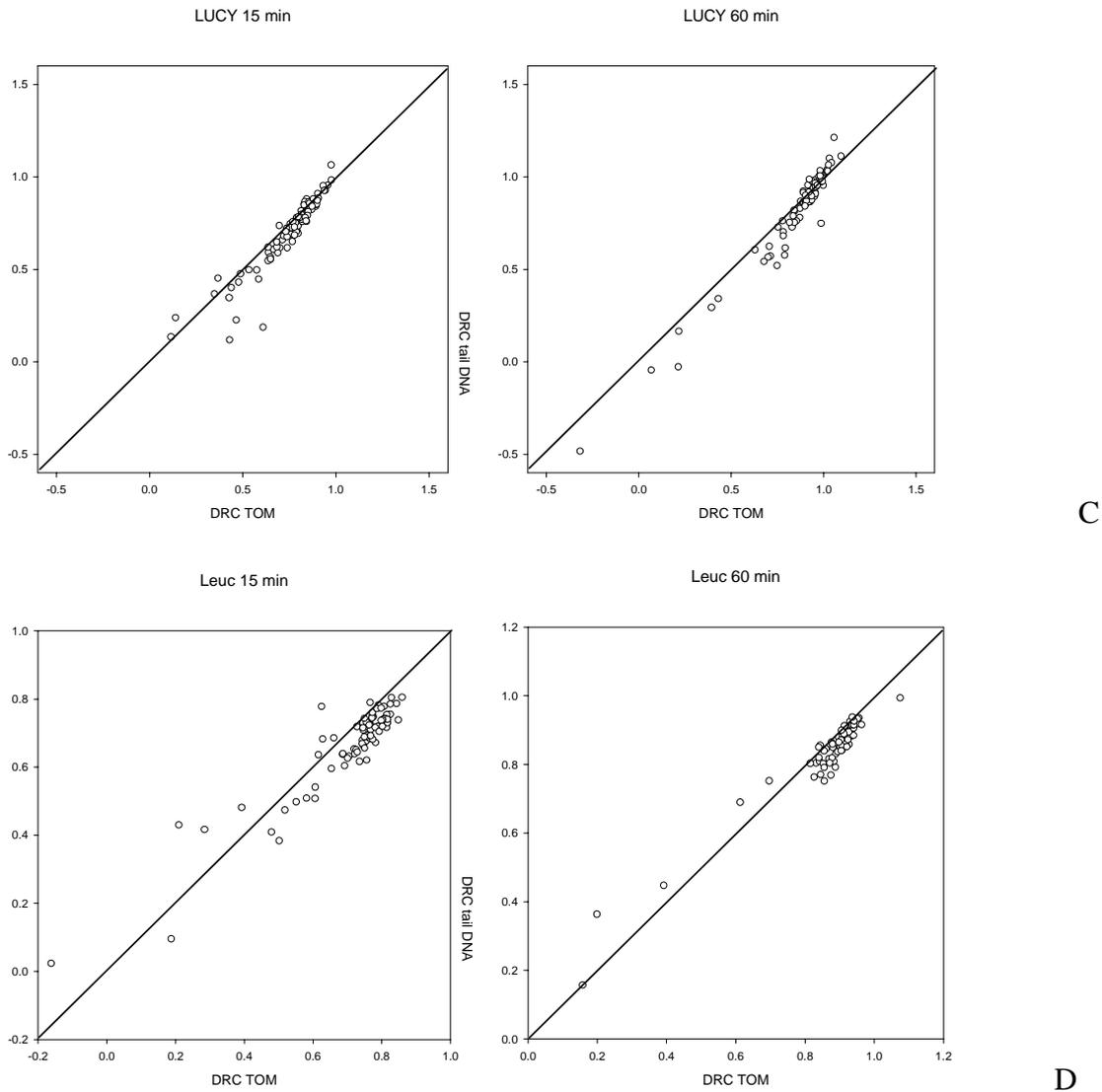


Abbildung 2.2.4: Gegenüberstellung der berechneten DRC-Werte auf der Basis der TOM-Daten bzw. der tail-DNA-Daten für die verschiedenen Kohorten; A: Standardkontrolle, B: KORA-Kollektiv, C: LUCY-Kollektiv, D: Leukämie-Kollektiv; jeweils nach 15 min (links) und 60 min (rechts) Inkubationszeit (= Reparaturzeit) nach Bestrahlung mit 4 Gy.

In Abbildung 2.2.4/1 (Seite 9) ist die Verteilung der Reparaturkapazität für die Individuen aller Kohorten (Gruppen) für $t=15$ min bzw. $t=60$ min nach Bestrahlung, auf der Basis der TOM-Werte, aufgetragen. Es zeigte sich, dass der 15 min-Wert, wie erwartet und von anderen Studien gezeigt, eine starke Streuung der Einzelwerte in den verschiedenen Kollektiven aufweist. Die Werte der Standardkontrolle und der KORA-Kontrollen liegen hier (mit 1 bzw. 2 Ausnahmen) näher zusammen als die Werte der LUCY- und Leukämie-Patienten.

Nach 60 min Reparaturzeit ist ein Großteil der DNA in den meisten Proben (nahezu) vollständig repariert. Die Einzelwerte der Kohorten liegen hier dichter zusammen, aber die Unterschiede zwischen den Populationen werden sehr viel deutlicher: Die Werte der Standardkontrolle (1 Ausnahme) und der KORA-Kontrollen (3 Ausnahmen) liegen sehr dicht zusammen bei nahezu vollständiger Reparatur. Die Werte für die LUCY- und die Leukämiepatienten zeigen sehr viel stärkere Schwankungen innerhalb der Kohorte; LUCY streut am stärksten. Die Mittelwerte der Leukämie-Kohorte liegen bei 15 min und 60 min etwas tiefer als bei den KORA-Kontrollen.

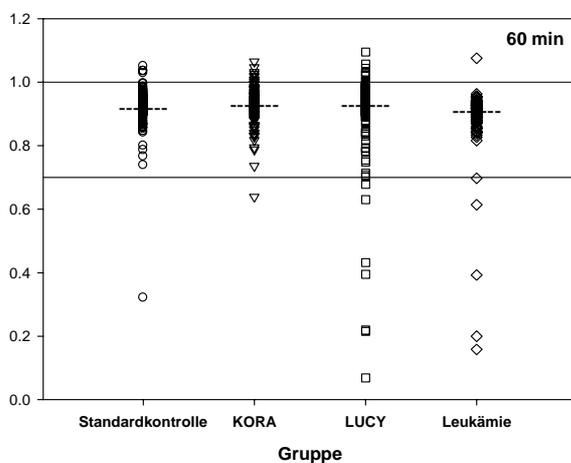
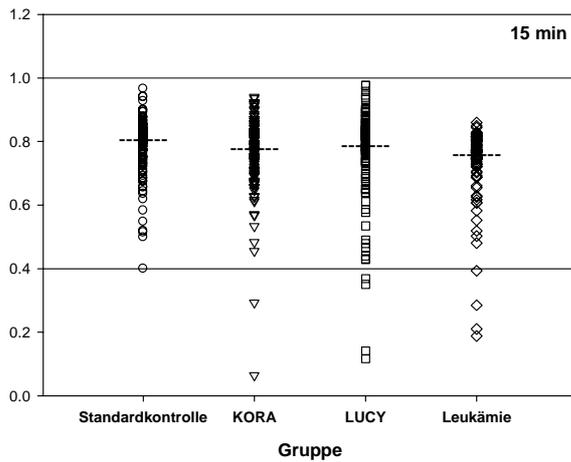


Abbildung 2.2.4/1: Reparaturkapazitäten (DRC) basierend auf TOM-Medianen (alle Kohorten); die gestrichelten Linien der jeweiligen Kohorten geben die Mediane an; die durchgezogenen Grenzen markieren die Standardabweichungen der Standardkontrollen. Der untere Schwellenwert definiert sich als die auf eine Kommastelle gerundete Streuung der Kontrollen ohne Berücksichtigung des einen Ausreißers. (Der obere Schwellenwert ist 1.0)

Nimmt man als alternative Auswertemethode den Median der *tail*-DNA als Kriterium nicht-reparierter Zellen für die Auswertung, zeigt sich eine ähnliche Tendenz. In Abbildung 2.2.4/2 (Seite 10) ist die Verteilung der Reparaturkapazität für die Individuen aller Gruppen auf der Basis der *tail*-DNA-Mediane aufgetragen.

Es zeigt sich auch hier nach 15 min eine starke Streuung der Einzelwerte in den verschiedenen Kollektiven. Die LUCY-Poben streuen am stärksten, während Leukämie-Proben wiederum einen etwas geringeren Median haben (nicht dargestellt).

Nach 60 min Reparaturzeit ist die DNA in den Zellen der meisten Proben nahezu vollständig repariert; es verstärken sich die Unterschiede zwischen den Populationen. Die Werte der Standardkontrolle (2 Ausnahmen) und die KORA-Kontrollen (1 Ausnahme) liegen sehr dicht zusammen bei nahezu vollständiger Reparatur. Bei den LUCY- und Leukämiepatienten sind Proben mit stark reduzierter DNA-Reparaturkapazität erkennbar.

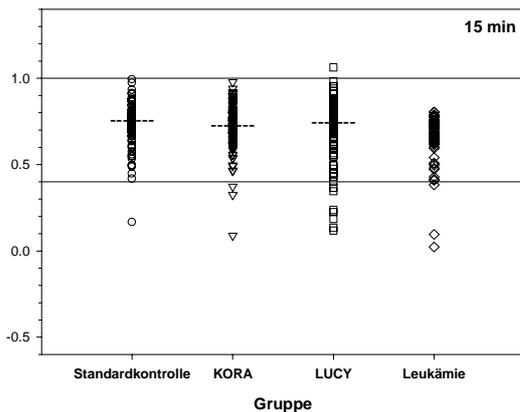


Abbildung 2.2.4/2: Reparaturkapazitäten (DRC) basierend auf tail-DNA- Medianen (alle Kohorten): die gestrichelten Linien der jeweiligen Kohorten geben die Mediane an; die durchgezogenen Grenzen markieren die Standardabweichungen der Standardkontrollen. Der untere Schwellenwert definiert sich als die auf eine Kommastelle gerundete Streuung der Kontrollen ohne Berücksichtigung des einen Ausreißers. (Der obere Schwellenwert ist 1.0)

Die Datensätze zu den Comet assays wurden von unterschiedlichen Auswerte-Personen, z.T. in München, sowie in Jena, unter Zuhilfenahme unterschiedlicher *hardware* und *software* generiert. Die Meta-Analyse der Daten konnte nur auf der Basis der Formel für die DNA-Reparaturkapazität erfolgen. Trotzdem zeigt sich ein erstaunlich kohärentes Bild für die generierten Daten, die folgende Tendenzen aufweisen:

- Die Streuung der individuellen Unterschiede ist nach 15 min Reparaturzeit größer als nach 60 min, analog zu früheren Daten.
- Nach 60 min sind i.d.R. nahezu alle DNA-Schäden „repariert“.
- Das Mitführen einer internen Standardkontrolle verdeutlicht eine nicht geringe inter-experimentelle Schwankung, insbesondere beim 15 min-Wert.
- Die Werte der LUCY-Kohorte sind von denen der unauffälligen KORA-Proben unterscheidbar. Die LUCY-Proben streuen stärker, es gibt „Ausreißer“.
- Basierend auf den Mittelwerten zeigt die LUCY-Kohorte einen minimal erhöhten DRC (nach 15 min) verglichen mit den KORA-Kontrollen; die Leukämiekohorte einen deutlicher reduzierten DRC.
- Basierend auf den Mittelwerten zeigen alle Kohorten nach 60 min einen nahezu identischen DRC, mit Ausnahme der Leukämie-Kohorte. Die Leukämie-Proben zeigen als Gesamt-Kohorte nach 60 min weniger Reparatur als die anderen Kohorten.
- Bei den Einzelwerten der Leukämie-Kohorten ist auffällig, dass nach 15 min kein einziger Wert über 0.8 DRC rangiert, während dies bei anderen Kohorten oft der Fall ist.

Für die übergeordnete Interpretation der Daten muss allerdings bedacht werden, dass durch das Nichterfassen apoptotischer Zellen in Proben mit sehr hoher (auch spontaner) Apoptose lediglich eine Teil-Population der Zellen im Comet-Assay gemessen wird. Inwieweit diese Teilpopulation das Verhalten der gesamten Population repräsentiert, ist ungewiss.

2.3 Apoptose-Assay an primären Lymphozyten

2.3.1. Grundlagen und Methodik: AnnexinV-Assay

Ein wesentlicher Teil des Projekts besteht in der Frage, in welchem Maße ionisierende Bestrahlung bei Lymphozyten Apoptose und Nekrose auslöst. Diese Untersuchung ist die Grundlage für eine entsprechende Einteilung der untersuchten Patienten und gesunden Kontrollpersonen in Fälle mit hoher, mittlerer und geringer Apoptose-Induktion. Zur Quantifizierung dieses Effekts wurde der schon im Vorläuferprojekt gut etablierte und weithin verwendete AnnexinV/Propidiumiodid-Assay eingesetzt, der methodisch auf der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) basiert. Die Methode ist im Anhang 8.2.3.1 beschrieben. Apoptotische Zellen können aufgrund ihrer charakteristischen Externalisierung der Zellmembrankomponente Phosphatidylserin das AnnexinV binden, jedoch bleibt ihre Zellmembran für Propidiumiodid (zunächst) undurchlässig. Anders dagegen nekrotische Zellen, die sowohl AnnexinV binden als auch Propidiumiodid aufnehmen. Somit können lebende, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden und quantifiziert werden.

Wie in Abbildung 2.3.1 ersichtlich, wird nach der Bestrahlung in den primären Lymphozyten die strahleninduzierte Apoptose gut anhand der AnnexinV/PI-Färbung sichtbar. Der durch Bestrahlung induzierte Anteil nekrotischer Zellen setzt sich aus tatsächlich nekrotischen Vorgängen sowie späten apoptotischen Zellen zusammen, die im weiteren Verlauf der Apoptose für PI durchlässig werden und daher im nekrotischen Fenster erscheinen.

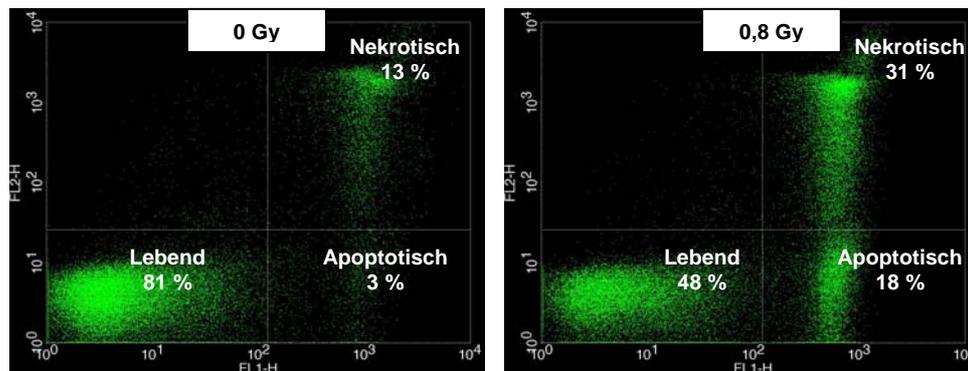


Abbildung 2.3.1: Beispielhafter Apoptose-Assay an den Lymphozyten einer internen Laborkontrolle (Standardkontrolle). FL1-H (Abszisse) bezeichnet die Intensität der AnnexinV-Fluoreszenz (apoptotische Zellen), FL2-H (Ordinate) bezeichnet die Intensität der PI-Fluoreszenz (spät-apoptotische oder nekrotische Zellen), 48 h nach Bestrahlung.

2.3.2. Überlegungen zur statistischen Auswertung

Im Vorläuferprojekt sowie in weiteren Vorversuchen wurde deutlich, dass die Qualität der eingefrorenen Proben bzgl. ihres Anteils lebender Zellen sehr unterschiedlich war. Gründe hierfür können sein: i) Unterschiedlich lange Transport- und/oder Lagerzeiten des Blutes, bevor daraus die primären Zellen isoliert werden, ii) Verluste beim Einfrieren/Auftauen der Zellen; iii) individuelle Unterschiede der Vitalität des Zellmaterials durch Probandenspezifische Gründe (Alter, Vorbehandlung im Rahmen einer Krebstherapie, andere Vorerkrankungen, etc.).

Es war daher mit Proben zu rechnen, die nach Isolieren, Einfrieren und Auftauen der Zellen einen hohen Anteil toter (apoptotischer und/oder nekrotischer) Zellen aufweisen. In solchen Proben, die bereits ohne Bestrahlung 50 - 80 % tote Zellen enthalten können, ist der Nachweis der strahleninduzierten Apoptose mit konventionellen Berechnungen sehr fehleranfällig. Es wurde daher vom Biostatistiker H. Braselmann (Helmholtz Zentrum München) eine verbesserte Formel zur Berechnung der strahleninduzierten Apoptose erstellt. Diese sollte auch in Proben mit hoher Anzahl spontan apoptotischer Zellen eine verlässliche Aussage zur Apoptoseinduktion nach Bestrahlung ermöglichen.

Als Bezeichnungen für die gemessenen Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen dienen:

$P_{apo,0}$ und P_{apo}	für apoptotische Zellen bei 0 Gy oder nach Bestrahlung
$P_{nec,0}$ und P_{nec}	für nekrotische Zellen bei 0 Gy oder nach Bestrahlung
$P_{tot} = P_{apo} + P_{nec}$	für den Gesamtanteil geschädigter Zellen nach Bestrahlung
$P_{tot,0} = P_{apo,0} + P_{nec,0}$	für den Gesamtanteil geschädigter Zellen bei 0 Gy

Der induzierte Gesamtstrahlenschaden $P_{tot,ind}$ wird hier als die Wahrscheinlichkeit definiert, dass eine normale, ungeschädigte Zelle bei Bestrahlung apoptotisch oder nekrotisch wird. Es ist der Anteil von strahlengeschädigten Zellen

in den vor Bestrahlung normalen Zellen

$$\frac{P_{tot} - P_{tot,0}}{1 - P_{tot,0}}$$

d.h.

$$P_{tot,ind} = \frac{P_{tot} - P_{tot,0}}{1 - P_{tot,0}}$$

Ebenso wird die induzierte Nekrose definiert als Anteil strahleninduzierter nekrotischer Zellen in nicht-nekrotischen Zellen,

$$P_{nec,ind} = \frac{P_{nec} - P_{nec,0}}{1 - P_{nec,0}}$$

Bei den nicht-nekrotischen Zellen $1 - P_{nec,0}$ wird hier kein Unterschied zwischen normalen oder apoptotischen Zellen gemacht, d.h. beide haben dieselbe Chance per Strahleninduktion nekrotisch zu werden.

Ähnlich wird auch die induzierte Apoptose definiert als Anteil strahleninduzierter apoptotischer Zellen in normalen Zellen. Dabei dürfen bei der Berechnung der strahleninduzierten apoptotischen Zellen nur die spontan apoptotischen abgezogen werden, die nicht nekrotisch geworden sind, $P_{apo,0}(1 - P_{nec,ind})$, also....

$$P_{apo,ind} = \frac{P_{apo} - P_{apo,0}(1 - P_{nec,ind})}{1 - P_{tot,0}}$$

Die Formeln können auch visuell im Wahrscheinlichkeitsdiagramm dargestellt werden. Dabei stellen die Pfeile 0 Gy nach x Gy die Übergangswahrscheinlichkeiten des Zellstatus bei Strahleninduktion dar. Die normalen Zellen $1 - P_{\text{tot}}$ sind hier mit P_{nor} bezeichnet. Die von 0 Gy ausgehenden Pfeile stellen die Möglichkeiten dar und summieren sich jeweils zu 1.0. Die x Gy eingehenden Pfeile, jeweils multipliziert mit dem Kontrollwert des Ursprungs, summieren sich als Beiträge zu dem jeweiligen Endstatus. Aus den drei Gleichungen (für jeden Endstatus eine) ergeben sich durch Umstellung die vorherigen Gleichungen.

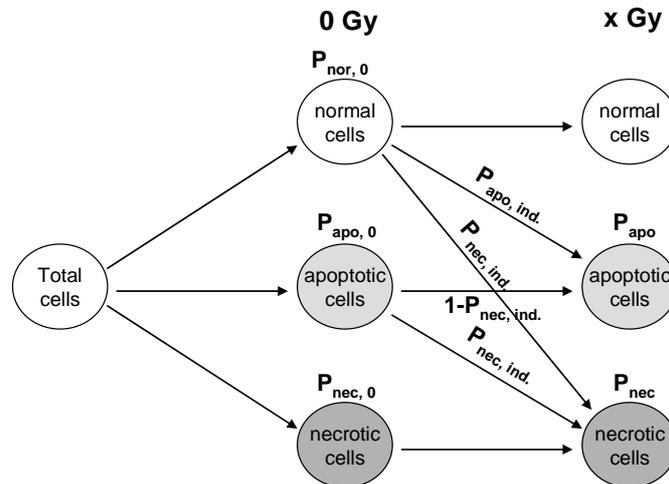


Abb. 2.3.2: Wahrscheinlichkeitsdiagramm für die Strahleninduktion von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Beschreibung siehe im Text.

- In den Tabellen werden die „P“-Werte prozentual angegeben, d.h. mit 100 multipliziert.
- Als statistischer Endpunkt wird schließlich die induzierte Apoptose, $P_{\text{apo,ind}}$ benutzt.
- Aufgrund statistischer Variabilität können sich für die induzierte Apoptose $P_{\text{apo,ind}}$ ebenso wie für die nicht weiter benutzten Endgrößen negative Werte ergeben. Dies kommt häufig vor, wenn die 0-Werte schon relativ groß sind und der gemessene Gesamtschaden nach 0,4 oder 0,8 Gy im Streubereich des 0-Wertes kleiner als dieser ist, sodass sich negative Differenzen ergeben.
- Die Endwerte $P_{\text{apo,ind}}$ wurden schließlich mit entsprechenden Werten der Standardkontrolle auf experimentelle lineare Korrelation überprüft und bei signifikanter Korrelation so korrigiert, dass (bis auf eine unabhängige Mittelwertskonstante zwecks Darstellung) nur die Differenz zum experimentellen Erwartungswert genommen wurde.

2.3.3. Durchführung

Wie in den Vorüberlegungen vermutet, wurde eine stark unterschiedliche Probenqualität in den individuellen Proben jeder Kohorte entdeckt. Anhand des Beispiels der KORA-Proben wird dies veranschaulicht. In Abb 2.3.3 sind die Zahlen lebender Zellen in den verschiedenen Proben dokumentiert. Diese wurden durch Subtraktion der spontanen Apoptose- und Nekrosewerte der Zellen erhalten, die nach Auftauen der Zellen - ohne Bestrahlung - in den jeweiligen Nullwerten der Bestrahlungsexperimente auftraten. Als internes Qualitätskriterium wurde bestimmt, dass nur Fälle mit mindestens 20% lebender Zellen zur Auswertung der strahleninduzierten Apoptose verwendet wurden.

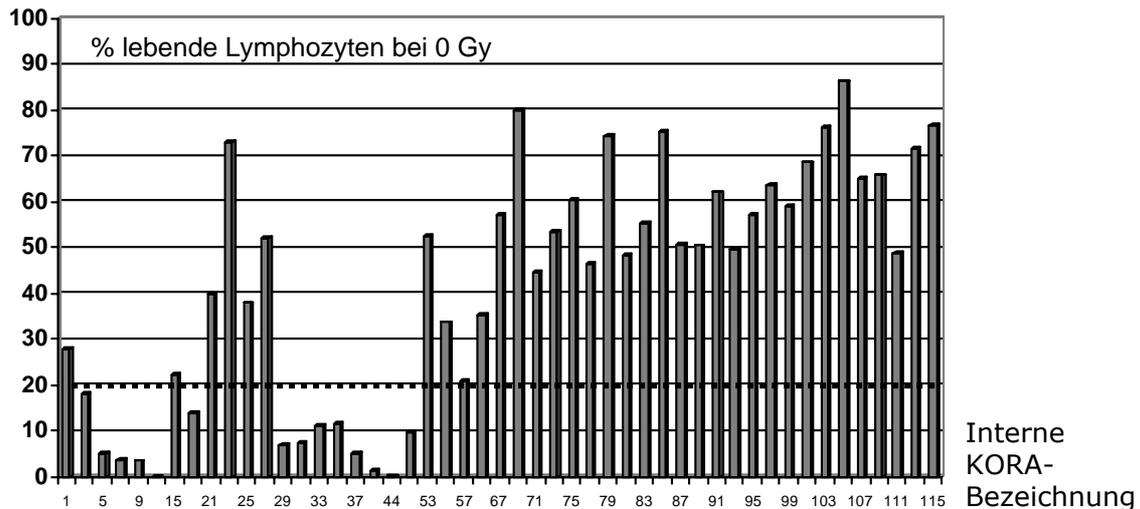


Abbildung 2.3.3: Qualität des Ausgangsmaterials: Aufgetragen ist der Prozentsatz lebender Zellen in individuellen KORA-Proben, nach Subtraktion der spontanen Apoptose- und Nekrosewerte, die nach Auftauen der Zellen - ohne Bestrahlung – in den jeweiligen Nullwerten der Bestrahlungsexperimente auftraten. Als internes Qualitätskriterium wurde bestimmt, dass nur Fälle mit mindestens 20% lebender Zellen (gestrichelte Linie) zur Auswertung der strahleninduzierten Apoptose verwendet wurden.

2.3.4. Ergebnisse und Interpretation

2.3.4.1. Stark unterschiedliche Qualität des Ausgangsmaterials

Wie bereits im Abschnitt zuvor erläutert waren die Proben qualitativ stark unterschiedlich. Trotzdem konnte mit den in die Auswertung einbezogenen Proben eine gute Apoptosemessung und eine verlässliche Apoptose-Kalkulation mit Hilfe der „Brasemann-Formel“ erreicht werden. Zur Erkennung von Proben mit extremen Apoptose-Werten wurden diese zunächst bezüglich ihrer Dosis-Korrelation in einem vereinfachten Rangordnungs-Verfahren validiert.

2.3.4.2. Dosis-Korrelationen bei 0,4 und 0,8 Gy:

Die Fälle wurden jeweils nach ihrer induzierten Apoptose bei 0,4 Gy und 0,8 Gy in aufsteigender Reihenfolge angeordnet, d.h. die Liste der Rangfolge beginnt für jede der beiden Strahlendosen mit den Fällen, die eine minimale Apoptose aufweisen (KORA siehe 2.3.4.2.K im Anhang, LUCY siehe 2.3.4.2.L, Leukämien siehe Tabelle 2.3.4.2.Leu).

Jeder Fall nimmt damit für jede Dosis einen bestimmten Rang ein. Bei der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen der apoptotischen Wirkung und geringen Strahlendosen wie 0,4 Gy und 0,8 Gy sollte dieser Rang bei beiden Dosen annähernd gleich sein. Um die Dosis-Korrelation zwischen den Kohorten vergleichen und quantifizieren zu können, wird folgende Einteilung vorgenommen: die Korrelation wird als gut bezeichnet, wenn maximal etwa 7 % Unterschied in den Rangplätzen vorliegt; in der KORA-Kohorte mit 113 Fällen sind dies 8 Rangunterschiede, bei LUCY und Leukämien mit geringeren Fallzahlen entsprechend weniger, nämlich 7 bzw. 5 Rangunterschiede (2.3.4.2 unten). Eine mittlere Korrelation wird jeweils mit bis zu 30 % Unterschied in den Rangplätzen festgesetzt, noch größere Unterschiede werden als schlechte Korrelation bezeichnet. Entsprechend dieser Einteilung können die einzelnen Fälle in eine der drei Kategorien eingeordnet werden. Insgesamt zeigt sich ein zufriedenstellendes Ergebnis

zwischen den apoptotischen Wirkungen der Strahlendosen 0,4 Gy und 0,8 Gy, da nach unserer Definition nur jeweils ca. 13 % der Fälle eine schlechte Dosis-Korrelation aufweisen.

Hervorzuheben ist, dass stets die induzierte Apoptose bei 0,8 Gy höher ist als bei 0,4 Gy, als auch bei den hier verwendeten, geringen Dosen eine klare Dosisabhängigkeit der strahleninduzierten Apoptose gemessen werden konnte. Die einzige Ausnahme hiervon sind Zellen der Kontrollperson Epk69, welche bei beiden Dosen die jeweils größte Apoptoserate der gesamten Kohorte aufweisen.

Tabelle 2.3.4.2: Dosis-Korrelation der Apoptose nach 0,4 Gy und 0,8 Gy Bestrahlung

KORA (113 Fälle):

Dosis-Korrelation	Rangunterschiede	Fälle
sehr gut	0 bis 8	45 (39,8 %)
mittel	9 bis 34	53 (46,9 %)
schlecht	mehr als 34	15 (13,3 %)

LUCY (96 Fälle):

Dosis-Korrelation	Rangunterschiede	Fälle
sehr gut	0 bis 7	31 (32,3 %)
mittel	8 bis 29	52 (54,2 %)
schlecht	mehr als 29	13 (13,5 %)

Leukämie (66 Fälle):

Dosis-Korrelation	Rangunterschiede	Fälle
sehr gut	0 bis 5	28 (42,4 %)
mittel	6 bis 20	29 (44,0 %)
schlecht	mehr als 20	9 (13,6 %)

2.3.4.3. Verteilung der Apoptose und „Ausreißer“ bei KORAs, LUCYs und Leukämien:

Die Werteverteilungen der Apoptoseinduktion in den verschiedenen Proben einer Kohorte sind nachfolgend für die beiden Dosen 0,4 Gy und 0,8 Gy aufgetragen. Die roten Balken markieren 2,5 Standardabweichungen der mitgeführten internen Kontrollen. Bei den normalen Kontrollpersonen der KORA-Kohorte (Abb. 2.3.4.3.K) und den jungen Lungentumor-Proben (Abb. 2.3.4.3.L) ist keine bzw. nur eine Probe vorhanden, die aufgrund deutlich reduzierter Apoptoseinduktion unter den Fehlerbalken liegen. Dagegen sind mehrere Proben mit erhöhter Apoptoseinduktion vorhanden.

Bei den Proben der Leukämiepatienten (Abb. 2.3.4.3.Leu) treten mehrere Proben auf, die deutlich unter den unteren Fehlerbalken fallen, die also eine reduzierte Apoptoseinduktion aufweisen. Es fällt auf, dass die Leukämieproben insgesamt deutlich geringere Werte (reduzierte Apoptose) aufweisen als die Proben der beiden anderen Kollektive, dass hier also generell die Apoptoseinduktion gesenkt ist.

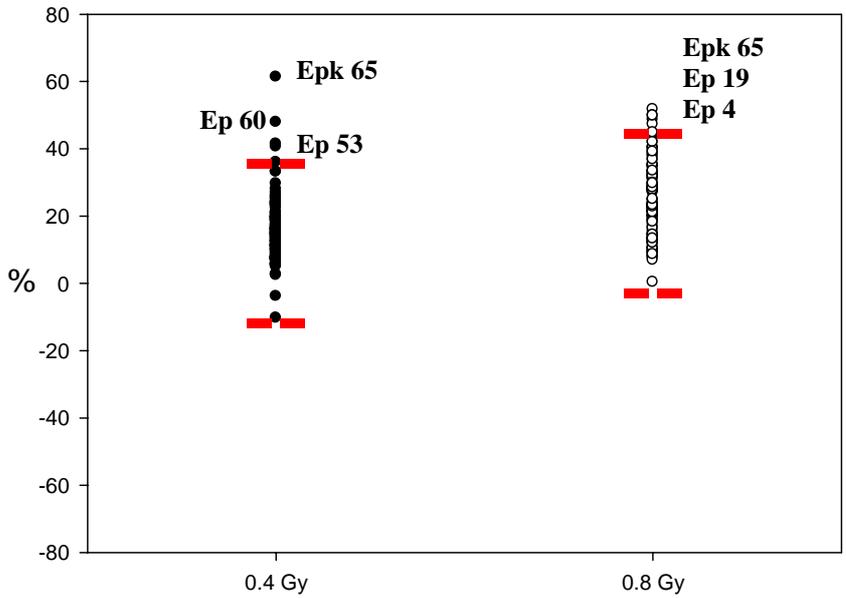


Abbildung 2.3.4.3 K: Strahleninduzierte Apoptose in Lymphozyten von gesunden Kontrollpersonen (KORA): Auf der Ordinate ist die induzierte Apoptose jeder Probe für 0,4 Gy und 0,8 Gy dargestellt, berechnet nach der „Braselmann-Formel“ (Abschnitt 2.3.2); Probenzahl $n = 113$. Die roten Balken markieren die Schwankungsbreite der mitgeführten Standardkontrollen. Namentlich gekennzeichnet sind Proben außerhalb dieser Schwankungsbreite.

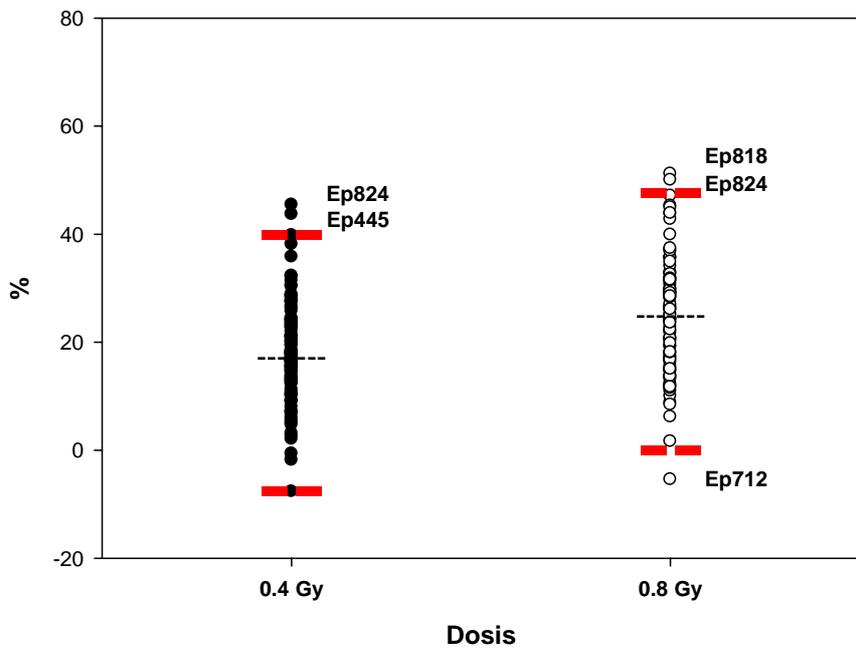


Abbildung 2.3.4.3 L: Strahleninduzierte Apoptose in Lymphozyten von jungen Lungentumor-Patienten (LUCY) Auf der Ordinate ist die induzierte Apoptose jeder Probe für 0,4 Gy und 0,8 Gy dargestellt, berechnet nach der „Braselmann-Formel“ (Abschnitt

2.3.2); Probenzahl $n = 96$. Die roten Balken markieren die Schwankungsbreite der mitgeführten Standardkontrollen. Namentlich gekennzeichnet sind Proben außerhalb dieser Schwankungsbreite. Die gestrichelte Linie markiert den median.

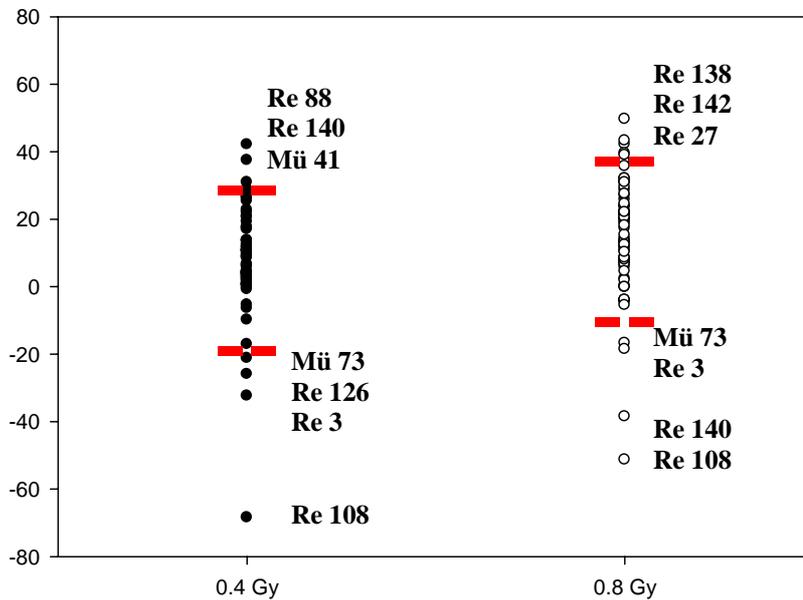


Abbildung 2.3.4.3 Leu: Strahleninduzierte Apoptose in Lymphozyten von Leukämie-Patienten: Auf der Ordinate ist die induzierte Apoptose jeder Probe für 0,4 Gy und 0,8 Gy dargestellt, berechnet nach der „Brasemann-Formel“ (Abschnitt 2.3.2); Probenzahl $n = 66$. Die roten Balken markieren die Schwankungsbreite der mitgeführten Standardkontrollen. Namentlich gekennzeichnet sind Proben außerhalb dieser Schwankungsbreite. Die gestrichelte Linie markiert den median.

In einem direkten Vergleich der Kohorten wurden die Mittelwerte der Apoptoseinduktion ermittelt. Für eine stringenteren Betrachtung wurden dafür Proben der Leukämiepatienten aus der Wertung genommen, die einen stark negativen Apoptosewert ergaben und möglicherweise als experimentelle Ausreißer zu werten sind. In den Abbildungen 2.3.4.3/2 und 2.3.4.3/3 sind die Mediane der KORA-Kontrollen bei 0,4 Gy und 0,8 Gy als verlängerte Achse dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Medianen der Kohorten wurden mit dem Wilcoxon Rangsummentest überprüft. Es fällt auf, dass die Leukämieproben insgesamt deutlich geringere Werte (reduzierte Apoptose) aufweisen als die Proben der beiden anderen Kollektive, dass hier also generell die Apoptoseinduktion gesenkt ist. ($p < 0.001$ für 0,4 und 0,8 Gy gegen LUCY, $p < 0.001$ für 0,4 und 0,8 Gy gegen KORA). Zwischen KORA und LUCY gibt es bei 0,8 Gy keinen Unterschied, bei 0,4 Gy nur marginal (Bonferroni p-Wert 0,06) (Anm.: der Bonferroni p-Wert berücksichtigt den Zufallseinfluß bei der gleichzeitigen Durchführung zweier Tests.)

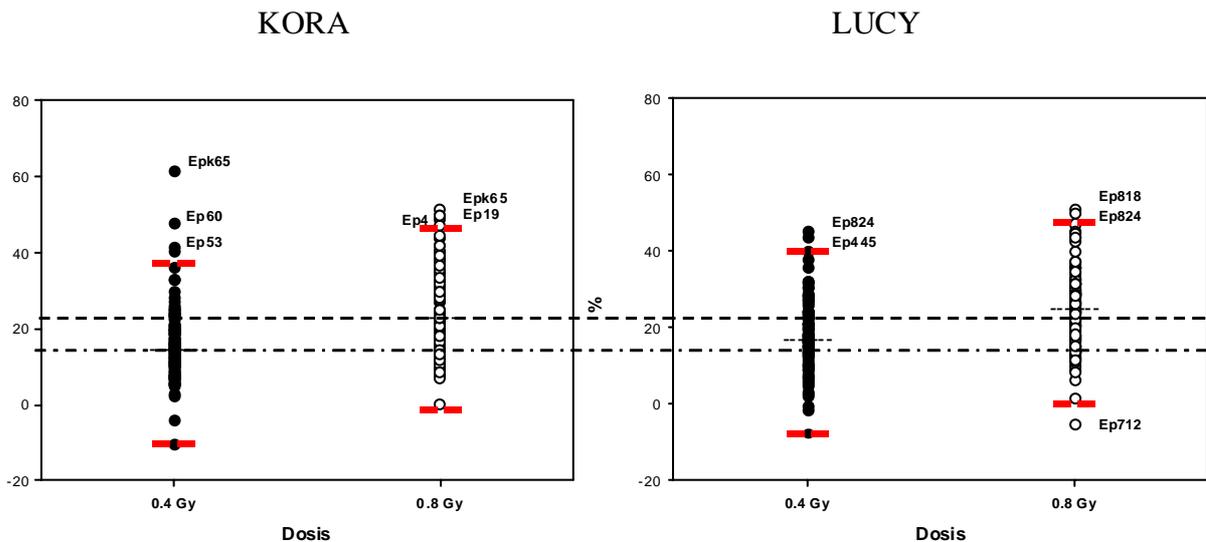


Abbildung 2.3.4.3/2: Vergleich der strahleninduzierten Apoptose in Lymphozyten von gesunden Kontrollpersonen (KORA, n=113) und junge Lungentumor-Patienten (LUCY, n=96)

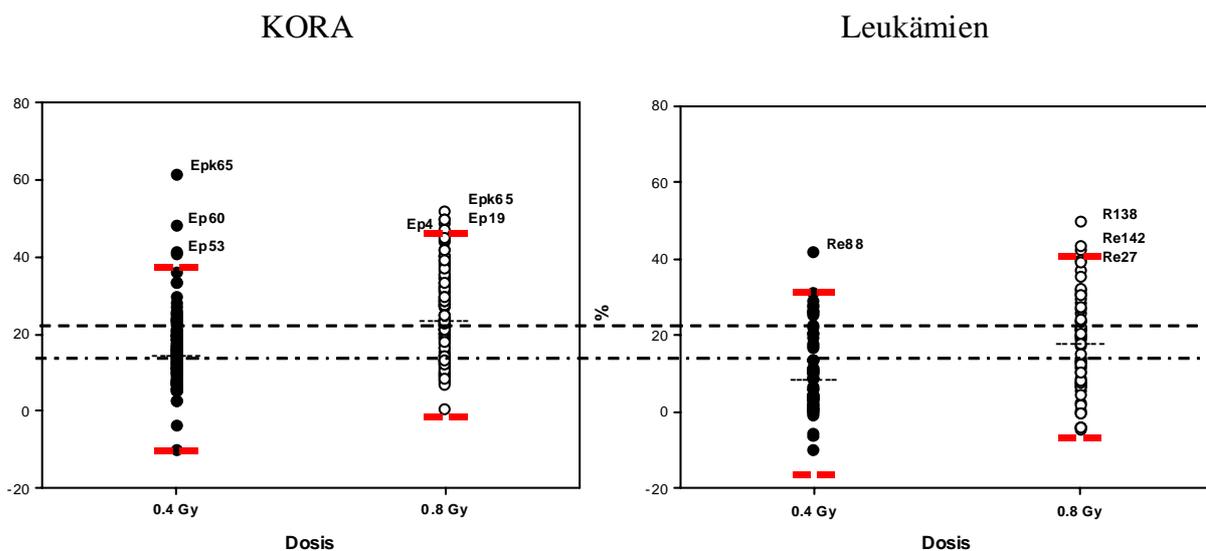


Abbildung 2.3.4.3/3: Vergleich der strahleninduzierten Apoptose in Lymphozyten von gesunden Kontrollpersonen (KORA, n=113) und Leukämie-Patienten (n=60)

Die im Vergleich zu den KORA-Kontrollen erhöhte Apoptoseinduktion der Zellen von jungen Lungentumor-Patienten ist derzeit nicht erklärbar. Das unterschiedliche Verhalten der Zellen von Leukämiepatienten im Vergleich zu den anderen Kohorten ist möglicherweise auf die Vorbehandlung der Patienten zurückzuführen. Diese haben bereits eine Chemotherapie durchlaufen, welche sich natürlich auch auf nicht-Krebszellen schädigend auswirken kann. Interessanterweise tritt dieser Unterschied der Leukämiepatientenzellen sowohl bei der Apoptoseinduktion, aber auch etwas schwächer bei der DNA-Reparatur im Comet Assay auf.

2.4 Korrelation: Comet- und Apoptose-Assay

Zur Einschätzung, ob die beiden zellulären Endpunkte Apoptose und DNA-Reparatur nach Bestrahlung unabhängig voneinander eintreten, wurden die experimentellen Ergebnisse der beiden Assays korreliert. Es stellte sich also die Frage, ob z.B. Zellen mit reduzierter DNA-Reparatur bevorzugt in die Apoptose getrieben werden, ob also in den Proben eine reduzierte DNA-Reparatur mit erhöhter Apoptose korreliert. Im Falle einer Korrelation der beiden Endpunkte wäre die Kombination der 2 Messmethoden deutlich aussagekräftiger zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

2.4.1 Korrelation auf Ebene der Gesamt-Kohorten

Vergleicht man die Mittelwerte der gesamten Kohorten bzgl. ihres DNA-Reparatur- und Apoptoseverhaltens, ausgehend von den gezeigten Abbildungen 2.2.4.1 bzw. 2.2.4.2 sowie 2.3.4.3/2 bzw. 2.3.4.3./3, so zeigt sich, dass im Vergleich zu den KORA-Kontrollen

- bei der LUCY-Kohorte eine unauffällige DNA-Reparatur mit einer erhöhten Apoptoseinduktion nach Bestrahlung einhergeht;
- bei der Leukämie-Kohorte eine (leicht) reduzierte DNA-Reparatur mit einer reduzierten Apoptoseinduktion einhergeht.

Während sich für die junge Lungentumor-(LUCY)-Kohorte hierfür keine Erklärung anbietet, kann bei der Leukämie-Kohorte wiederum vermutet werden, dass die Vorbehandlung der Patienten (Chemotherapie) auch in den gesunden Zellen eine veränderte oder reduzierte Reaktionsfähigkeit für exogenen Stress (Bestrahlung) mit sich bringen kann. Auf der Ebene der Gesamt-Kohorten kann man also einerseits eine reduzierte Reparatur mit reduzierter Apoptose (bei Leukämiezellen), andererseits unauffällige Reparatur mit leicht erhöhter Apoptose korrelieren.

Diese Korrelationen konnten jedoch statistisch nicht gesichert werden. Die gegenläufigen Korrelationen – in Abhängigkeit von der Kohorte – legen nahe, dass es sich hier um eine statistisch nicht-signifikante Korrelation der beiden Phänotypen handelt.

2.4.2 Korrelation auf Ebene der einzelnen Proben

Vergleicht man von jeder einzelnen Probe das Verhalten der Zellen in der DNA-Reparatur und in der Apoptoseinduktion, so kann man herausfinden, ob z.B. seltene Proben mit extremen Werten in beiden Phänotypen auffallend sind. Im Punktediagramm würden sich Anhäufungen für solche phänotypischen Korrelationen erkennen lassen. Im Anhang 8.2.4.2 sind die Apoptosewerte (für 0,4 Gy und 0,8 Gy) jeweils verglichen mit den DNA-Reparaturwerten (15 min und 60 min; basierend auf TOM oder *tail*-DNA). Die resultierenden Diagramme zeigen keine Subpopulationen der Kohorten, in denen Extremwerte für beide Phänotypen positiv oder negativ korrelieren. Auch in den Bereichen extremer Apoptose- oder DNA-Reparaturwerte sind keine einzelnen Proben erkennbar, die für beide Phänotypen auffällig sind.

Auch die Analyse auf Ebene der Einzelzellen legt also nahe, dass es keine Korrelation extremer Phänotypen bezüglich Apoptose und DNA-Reparatur nach Bestrahlung gibt.

3. Charakterisierung immortalisierter Zelllinien

3.1. Herstellung EBV-immortalisierter Zelllinien aus ausgewählten Patienten

3.1.1. Auswahlkriterien

Bedingt durch die verzögerte statistische Gesamt-Auswertung der Comet-Assays wurde die Immortalisierung interessanter Proben ausschliesslich basierend auf den Apoptose-Daten durchgeführt. Aus den untersuchten Kollektiven der gesunden Kontrollpersonen (KORA) und der jungen Lungentumor-Patienten (LUCY) wurden daher Fälle ausgewählt, die übereinstimmend sowohl nach Bestrahlung mit 0,4 Gy als auch nach Bestrahlung mit 0,8 Gy besonders hohe bzw. besonders niedrige Apoptoseraten zeigten. Dies sind die Fälle mit einer guten Dosis-Korrelation, wie es in 2.3.4.2 beschrieben wurde. Als Kontrolle wurden weiterhin Fälle ausgewählt, die übereinstimmend für beide Dosen mittlere Apoptoseraten aufwiesen. In den Tabellen 8.2.3.4.2 im Anhang sind die Fälle guter Dosis-Korrelation rot hervorgehoben. Die zur Immortalisierung eingesetzten Proben der LUCY und KORA-Kohorten sind aufgeführt, und als erfolgreich oder nicht erfolgreich gekennzeichnet.

Als weitere Kontrolle wurde eine auffällige Probe der Leukämie-Kohorte in der Immortalisierung mitgeführt.

3.1.2. Durchführung

Die Immortalisierung der Lymphozyten durch Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) erfolgte am Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München, wo dieses Verfahren routinemäßig durchgeführt wird. Dabei wird die Marmorset-Blutleukozytenlinie B 95-8 verwendet, die ein Wildtyp-EBV-Virus trägt.

3.1.2. Ergebnisse und Interpretation

Die Immortalisierung wird nach Aussage der Experimentatoren bei optimaler Menge und Qualität des eingesetzten Ausgangsmaterials mit einer Effizienz von über 90% standardisiert durchgeführt. Im Fall der hier verwendeten primären Zellproben wurde eine Effizienz von etwa 60% erreicht, da das zur Immortalisierung verbliebene primäre Zellmaterial bereits eingefroren war und suboptimale Zellzahlen enthielt. Während die Effizienz bei den KORA-Proben 71% betrug (15 von 21 erfolgreich) war sie bei den LUCY-Proben deutlich geringer mit 47% (8 von 17).

Folgende immortalisierte Zelllinien konnten gewonnen werden:

- Gesunde Kontrollpersonen (KORA, n = 15): sechs Zelllinien mit hoher, drei Zelllinien mit mittlerer und sechs Zelllinien mit niedriger Apoptoserate (Tabelle 3.1.2.).
- Junge Lungentumor-Patienten (LUCY, n = 8): vier Zelllinien mit hoher, eine Zelllinie mit mittlerer und drei Zelllinien mit niedriger Apoptoserate (Tabelle 3.1.2.).
- Leukämie-Patient: eine Probe mit auffällig geringer Apoptoserate wurde erfolgreich immortalisiert und als Kontrolle im weiteren Verlauf mitgeführt.
- interne Labor-Kontrollen: von den unauffälligen internen Laborkontrollen wurden ebenfalls 2 immortalisierte Zelllinien generiert, die als methodische Kontrollen für weitere Experimente mitliefen.

Table 3.1.2.1: EBV-Immortalisierung von Lymphozyten der ausgewählten Kontrollpersonen (KORA).

Induzierte Apoptose	KORA-Bezeichnung (interne Bezeichnung)	EBV-Immortalisierung -- erfolglos X erfolgreich
Hoch	1418306 (EpK63)	--
	1452843 (Ep 59)	X
	1467846 (EpK 73)	X
	1434457 (Ep53)	X (in Jena nicht verfügbar)
	1442168 (Ep 60)	X
	1420961 (Ep4)	X (in Jena nicht verfügbar)
	1467304 (EpK 80)	X
Mittel	1412132 (Ep29)	--
	F4-D1N/1829455 (KORA 79)	X
	1457852 (Ep10)	--
	1416785 (EpK 69)	X
	F4 CON/1848770 (KORA 23)	X
Niedrig	F4-DON/1842418 (KORA 85)	X
	F4-DON/1813714 (KORA 83)	X
	F4-COV/1817816 (KORA 67)	--
	F4-DON/1845860 (KORA 95)	--
	F4-DON/1852505 (KORA 113)	X
	F4-EON/1810461 (KORA 107)	X
	F4-EON/1837718 (KORA 91)	--
	F4-EON/1830005 (KORA 89)	X
	F4-DON/1819645 (KORA 69)	X

Table 3.1.2.2: EBV-Immortalisierung von Lymphozyten der ausgewählten jungen Lungentumor-Patienten (LUCY).

Induzierte Apoptose	LUCY-Bezeichnung (interne Bezeichnung)	EBV-Immortalisierung -- erfolglos X erfolgreich
Hoch	8042-200 (Ep862)	X
	29018-200 (Ep600)	--
	8027-200 (Ep449)	X
	29023-200 (Ep772)	--
	3012-200 (Ep825)	--
	29031-200 (Ep935)	X
	4047-200 (Ep818)	X
Mittel	13024-200 (Ep436)	--
	6025-200 (Ep1040)	--
	29012-200 (Ep485)	X
	13020-200 (Ep108)	--

	19016-200 (Ep476)	- -
Niedrig	16042-200 (Ep1053)	- -
	20041-200 (Ep766)	- -
	12018-200 (Ep494)	X
	29019-200 (Ep602)	X
	29011-200 (Ep482)	X

3.2. Apoptose-Assays mit EBV-Zelllinien

3.2.1 Grundlagen und Methodik

Das Arbeitsprogramm sah vor, ausgewählte, nach Bestrahlung auffällige Proben der verschiedenen Kohorten zu immortalisieren um für weiterführende molekulare Analysen möglicher Ursachen der Strahlenauffälligkeit genug Zellmaterial zur Verfügung zu haben. Ein Überblick der an EBV-immortalisierten Zelllinien durchgeführten Experimente ist im Anhang (8.3.2.1 und 8.3.2.1/1) zu finden. Neben der genetischen Analyse war dies insbesondere die Analyse potentieller Kandidatenproteine, z.B. auf abnormal veränderte Proteinmengen, veränderte Proteingrößen oder fehlerhafte Regulation nach Bestrahlung. Die EBV-Immortalisierung sollte – zusätzlich zur Integration von EBV-Genomen in die „Wirtszelle“ – keine genetischen Veränderungen in der Zelle verursachen. Allerdings ist bekannt, dass eine Unzahl zellulärer Wirts-Proteine nach der Immortalisierung durch die EBV-Proteine in ihrer Aktivität reguliert werden können. Hierzu zählt u.a. das p53-Protein, weshalb eine Veränderung der Strahlenantwort der EBV-immortalisierten Zellen im Vergleich zu den primären Ausgangszellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Daher ist eine vergleichende Analyse von Proteinveränderungen in den strahlenauffälligen Proben nur sinnvoll, wenn auch der Phänotyp der daraus abgeleiteten EBV-Zellen nach Bestrahlung analysiert wird. Es wurden daher die Apoptoseraten in den EBV-immortalisierten Zellen ermittelt und in einer vergleichenden Analyse dem Apoptoseverhalten der zugehörigen primären Zellen gegenübergestellt.

3.2.2. SubG1-Assay

Da der AnnexinV-Assay sich für lymphoblastoide Zelllinien in Vorversuchen und parallelen Studien als problematisch und bei den Dosen 0,4 und 0,8 Gy als kaum messbar herausgestellt hat, wurde mit der Messung der hypodiploiden Zellfraktion ein alternativer durchflusszytometrischer Test zur quantitativen Untersuchung von Apoptose verwendet. Für diesen Test wird zunächst die Membran der untersuchten Zellen permeabilisiert, um Eindringen von Propodiumiodid in den Zellkern zu ermöglichen. Dies führt zu Anfärbung der DNA. Durch die Färbung und anschließende Messung im Durchflusszytometer kann der DNA-Gehalt der Zellen festgestellt werden. In einer gesunden Zellpopulation gibt es einen relativ großen Anteil an Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, des Weiteren einen kleineren Anteil an Zellen, die sich in der G2-Phase befinden und deshalb im Vergleich zu den in der G1-Phase befindlichen Zellen einen doppelten DNA-Gehalt aufweisen und entsprechend doppelt so starke Fluoreszenz zeigen. Im Bereich dazwischen befinden sich Zellen in der S-Phase. In geschädigten Zellpopulationen, die z. B. bestrahlt wurden, findet man eine weitere Zellpopulation, deren DNA-Gehalt geringer ist als in Zellen der G1-Phase. In diesem Fall spricht man von hypodiploiden Zellen oder SubG1-Zellen. Das Auftreten hypodiploider Zellen basiert darauf, dass im Zuge der Apoptose eine Degradierung der DNA und ein Verlust der degradierten DNA erfolgen. In

3.2.2 sind Histogramme für die Messung der hypodiploiden Zellfraktion einer EBV-immortalisierte Kontrollzelllinie nach Bestrahlung dargestellt und erklärt.

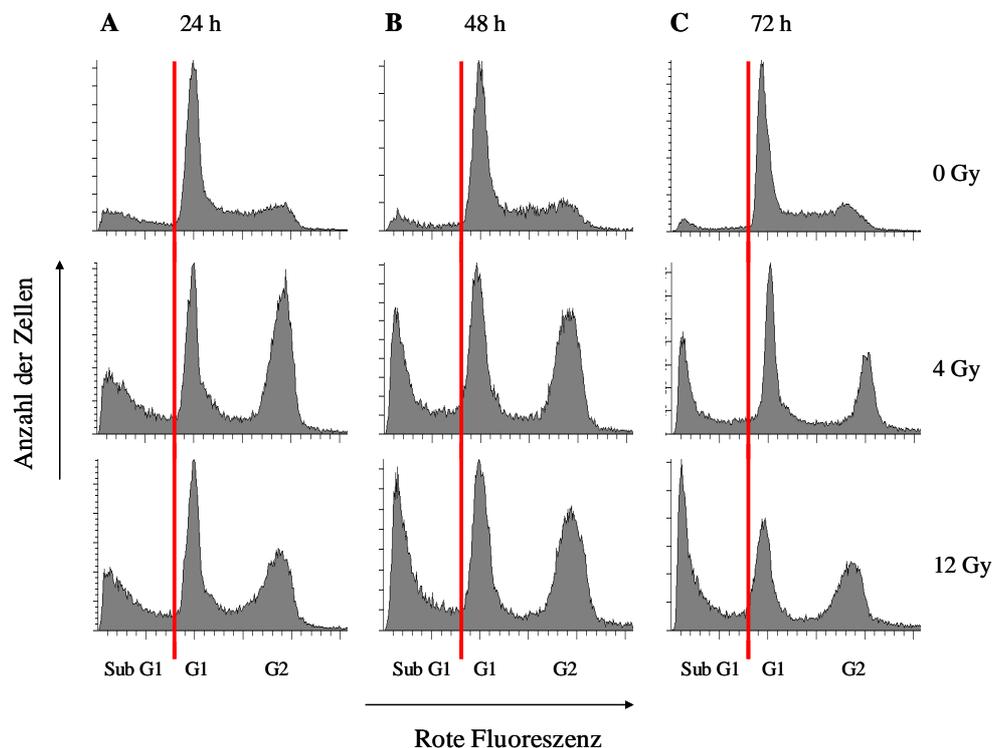


Abbildung 3.2.2: Histogramme der Fluoreszenz von PI bei durchflusszytometrischen Messungen der Sub G1 Population:

Die Messung erfolgt in unbestrahlten Zellen der Kontrollzelllinie SiMo sowie nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 12 Gy für die Zeitwerte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung. In jedem Diagramm wird die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Ordinate) gegen die rote Fluoreszenz von PI (Abszisse) aufgetragen.

Zu sehen ist zunächst in unbestrahlten Proben die Aufteilung der Zellen in eine G1-Population, eine G2-Population mit doppelter Fluoreszenzintensität von der G1-Population und eine kleine Sub G1-Population mit geringerer Fluoreszenzintensität. 24 h nach Bestrahlung stieg der Wert des Maximums für G2 auf der y-Koordinate drastisch an, dies beruht auf einem G2-Arrest der geschädigten Zellen. Im Bereich von Sub G1 erfolgte leichte Steigerung. Zu späteren Zeitwerten nach Bestrahlung schrumpfte die G2-Population, im Bereich Sub G1 trat eine weitere Zunahme ein. Die rot eingezeichneten Hilfslinien markieren die Grenze zwischen G1 und dem Sub G1-Bereich.

Die Messungen der Apoptoseraten in lymphoblastoiden Zelllinien mittels Nachweis der hypodiploiden Zellfraktion und mit Hilfe eines Caspaseinhibitors (siehe 3.2.3.) erfolgte in jeweils ein bis fünf Versuchen in folgenden Zelllinien die aus primären Zellen der LUCY-Kohorte generiert worden waren: Vier Zelllinien, deren korrespondierende primären Lymphozyten im AnnexinV-Assay auffällig hohe Apoptoseraten gezeigt hatten, drei Zelllinien, deren korrespondierende primären Lymphozyten im Annexin V Assay auffällig niedrige Apoptoseraten gezeigt hatten und eine Zelllinie mit durchschnittlicher Apoptoserate der korrespondierenden primären Lymphozyten. Die gewählten Parameter waren die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy. In Abbildung 3.2.2/1 sind die Daten der Apoptosemessungen an LUCY-Zelllinien zusammengefasst. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung zwischen den Zelllinien detektiert werden, die mit der Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen primären Vorläuferzellen korreliert.

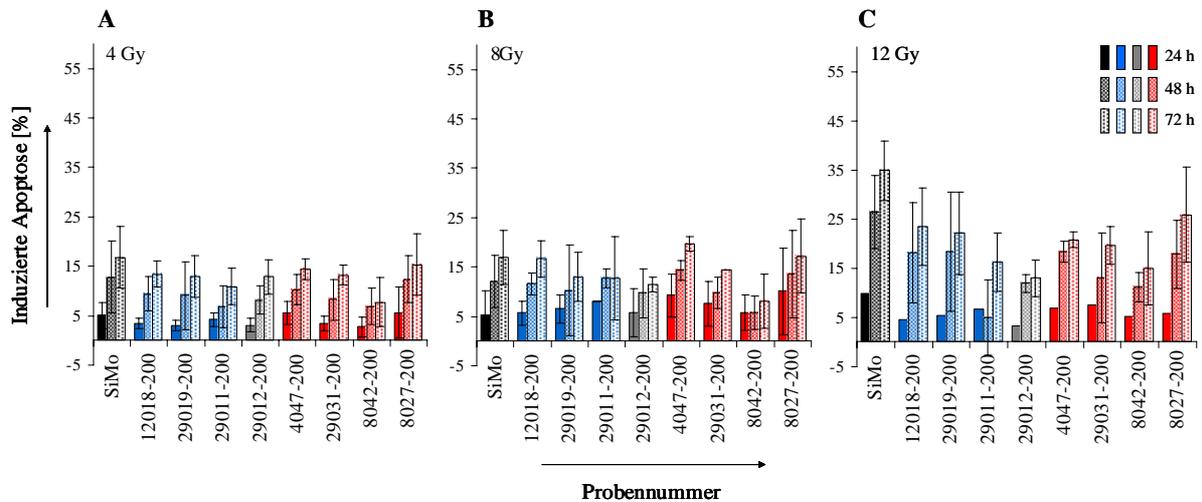


Abbildung 3.2.2/1 : Durch Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion gemessene induzierte Apoptoseraten in LUCY Zelllinien.

Die Rate der induzierten Apoptose wird für jede Zelllinie 24 h (dunkle Farben), 48 h (mittlere Farben) und 72 h (helle Farben) **A**: nach Bestrahlung mit 4 Gy, **B**: nach Bestrahlung mit 8 Gy, **C**: nach Bestrahlung mit 12 Gy angegeben. In schwarz wird die Kontrollzelllinie SiMo gezeigt, in blau Zelllinien, für die anhand der Ergebnisse im Annexin V Assay niedrige Induktion der Apoptose erwartet wird, in rot Zelllinien, für die hohe Apoptoseraten erwartet werden. Grau dargestellt ist eine Zelllinie mit erwarteter durchschnittlicher Apoptoserate. Für alle drei Dosen kann für jede Zelllinie ein Anstieg der induzierten Apoptose mit der Zeit festgestellt werden. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann kein Unterschied zwischen den ermittelten Werten nach Bestrahlung mit 4 Gy und 8 Gy festgestellt werden, jedoch die Dosis 12 Gy bewirkt deutlich höhere Apoptoseraten in den untersuchten Zelllinien.

Für das KORA-Kollektiv wurden sechs Zelllinien mit hoher Apoptoserate in den korrespondierenden primären Lymphozyten und entsprechend fünf Zelllinien mit niedriger Apoptoserate in den korrespondierenden primären Lymphozyten ausgewählt. Für die KORA-Zelllinien erfolgten die Versuche jeweils in zwei Wiederholungen für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit den Dosen 4 Gy und 12 Gy. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede der Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von der Strahlenempfindlichkeit der primären Vorläuferzellen detektierbar. In Abbildung 3.2.2/2 sind die Daten graphisch zusammengefasst. Aufgrund der großen Schwankungen zwischen den Versuchen kann auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden, der mit der Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen primären Vorläuferzellen korreliert.

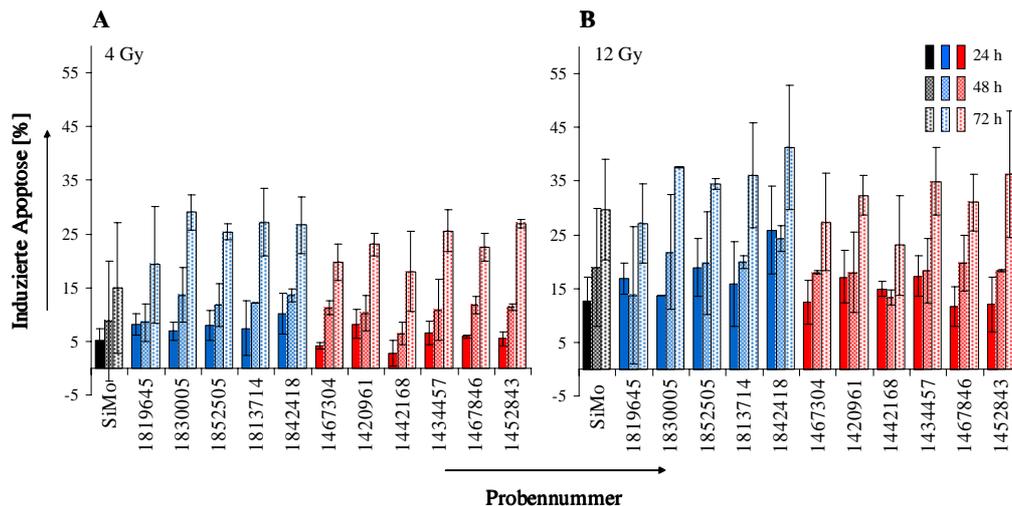


Abb. 3.2.2/2: Durch Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion gemessene induzierte Apoptoseraten in KORA Zelllinien.

Die Rate der induzierten Apoptose wird für jede Zelllinie 24 h (dunkle Farben), 48 h (mittlere Farben) und 72 h (helle Farben) **A**: nach Bestrahlung mit 4 Gy, **B**: nach Bestrahlung mit 12 Gy gezeigt. In schwarz ist die Kontrollzelllinie SiMo markiert, blau sind Zelllinien, für die anhand der Ergebnisse im AnnexinV-Assay geringe Induktion der Apoptose erwartet wird und rot sind Zelllinien gezeigt, für die hohe Apoptoseraten erwartet werden. Für beide Dosen ist für jede Zelllinie ein Anstieg der induzierten Apoptose mit der Zeit sichtbar. Ebenfalls kann ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate von 4 Gy auf 12 Gy festgestellt werden.

3.2.3. Caspase-Assay

Eine weitere Methode, Apoptose in lymphoblastoiden Zelllinien nachzuweisen, besteht in der Detektion von aktiven Caspasen, da Caspasen spezifisch während der Apoptose aktiviert werden. Eine Möglichkeit, aktive Caspasen indirekt nachzuweisen, besteht in der Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Caspase-Inhibitors. Der Caspase-Inhibitor VAD-FMK kann z. B. mit FITC konjugiert werden (FITC-VAD-FMK). Da die Membranen permeabel sind für dieses Konstrukt, kann es in nicht-fixierte Zellen eindringen und dort an das aktive Zentrum der Caspasen binden. Je mehr aktive Caspasen vorhanden sind, desto mehr Inhibitor-Konstrukt kann binden. Die Fluoreszenzaktivität markierter Zellen kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Die Versuche zur Analyse der Apoptose in LCL wurden jeweils nach einer Dosis von 4 Gy und 12 Gy sowie in einer unbestrahlten Kontrollprobe zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung durchgeführt. Resultierende Histogramme der Messung der Fluoreszenzintensität in Lymphozyten nach Behandlung mit einem fluoreszenzmarkierten Caspase-Inhibitor werden in 3.2.3 gezeigt und erklärt.

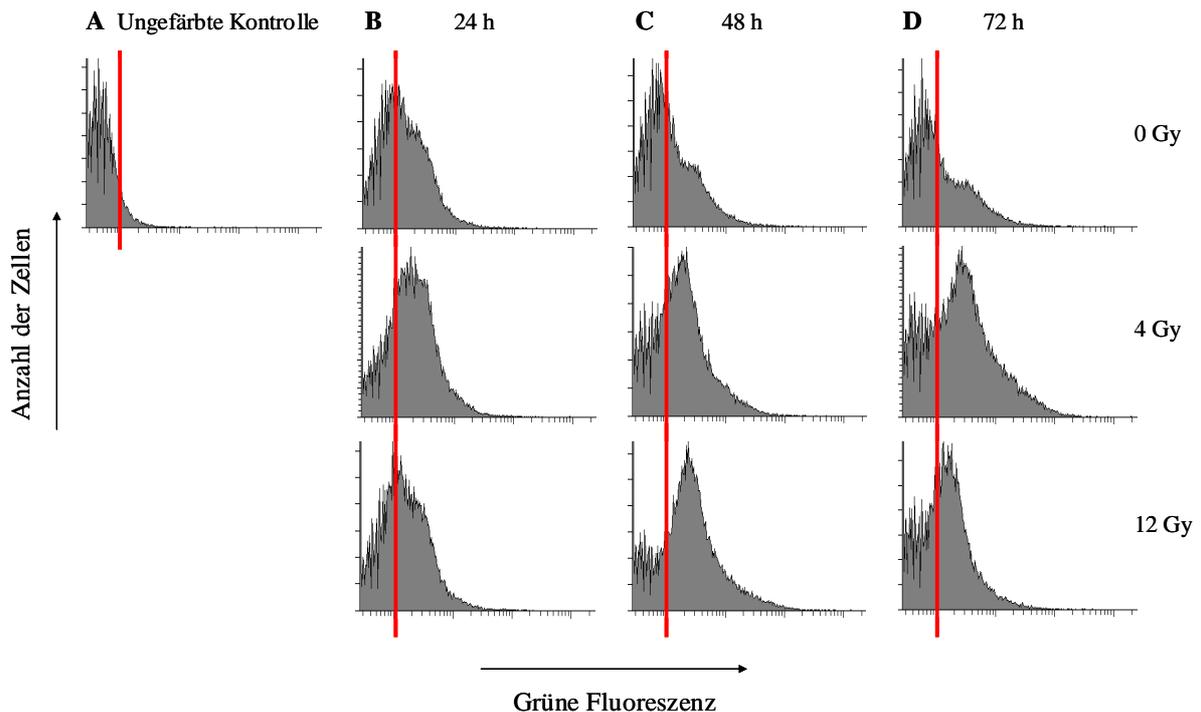


Abbildung 3.2.3: Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen der Fluoreszenzintensität von Lymphozyten nach Behandlung mit dem fluoreszenzmarkierten Caspase-Inhibitor FITC-VAD-FMK.

Die Messung erfolgte in unbehandelten Zellen der Kontrollzelllinie SiMo sowie nach ionisierender Bestrahlung mit 4 Gy bzw. 12 Gy für die Zeitwerte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung. In jedem Diagramm wird die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Ordinate) gegen die grüne Fluoreszenz von FITC (Abszisse) aufgetragen. A: Eine ungefärbte Kontrollprobe, durch die die Autofluoreszenz der Zellen festgestellt werden kann. B: Messung 24 h nach Bestrahlung. C: Messung 48 h nach Bestrahlung. D: Messung 72 h nach Bestrahlung.

Unter Anwendung der in Abb.3.2.3 gezeigten Methodik wurden wiederum die LUCY- und KORA-Zelllinien bzgl. der strahleninduzierten Apoptose gemessen. Bei den LUCY-Zelllinien (Abb. 3.2.3/1) konnte zwischen den Bestrahlungen mit 4 Gy und 8 Gy kein Unterschied festgestellt werden, ebenso zwischen den unterschiedlichen Zelllinien. Nach Bestrahlung mit 12 Gy sind die ermittelten Medianen leicht erhöht gegenüber den Werten für 4 Gy.

Bei Anwendung mit den KORA-Zelllinien, diesmal ohne die 8 Gy-Bestrahlungsdosis, konnte für jede der beiden Dosen (4 Gy, 12 Gy) ein Anstieg des Median zwischen 24 h und 48 h, jedoch ein Abfall nach 72 h festgestellt werden. Zwischen den verschiedenen Dosen kann kein Unterschied festgestellt werden, ebenso zwischen den unterschiedlichen Zelllinien.

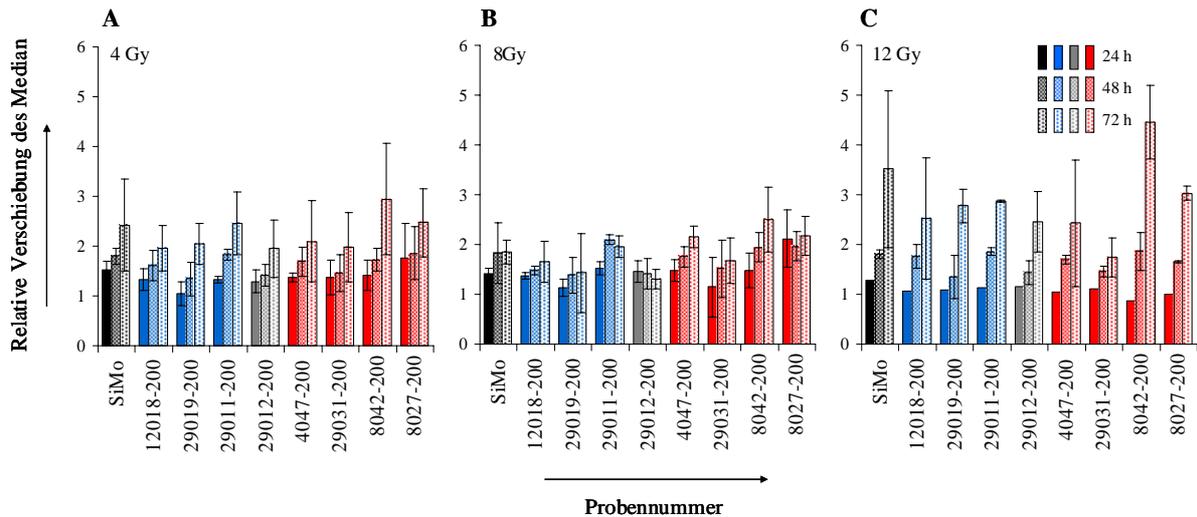


Abb. 3.2.3/1: Detektion von Caspasen in LUCY Zelllinien.

Die relative Verschiebung des Median wird für jede Zelllinie 24 h (dunkle Farben), 48 h (mittlere Farben) und 72 h (helle Farben) **A**: nach Bestrahlung mit 4 Gy, **B**: nach Bestrahlung mit 8 Gy, **C**: nach Bestrahlung mit 12 Gy angegeben. In schwarz wird die Kontrollzelllinie SiMo gezeigt, in blau Zelllinien, für die anhand der Ergebnisse im AnnexinV-Assay niedrige Induktion der Apoptose erwartet wird, in rot Zelllinien, für die hohe Apoptoseraten erwartet werden. Grau dargestellt ist eine Zelllinie mit erwarteter durchschnittlicher Apoptoserate. Für jede der drei Dosen kann ein Anstieg des Median mit der Zeit beobachtet werden.

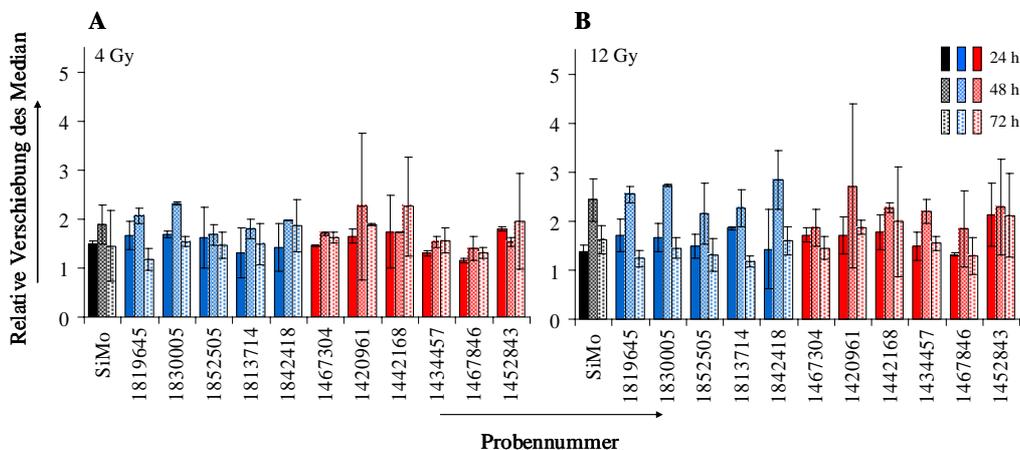


Abb. 3.2.3/2: Detektion von Caspasen in KORA Zelllinien.

Die relative Verschiebung des Median wird für jede Zelllinie 24 h (dunkle Farben), 48 h (mittlere Farben) und 72 h (helle Farben) **A**: nach Bestrahlung mit 4 Gy, **B**: nach Bestrahlung mit 8 Gy. In schwarz wird die Kontrollzelllinie SiMo gezeigt, in blau Zelllinien, für die anhand der Ergebnisse im AnnexinV-Assay niedrige Induktion der Apoptose erwartet wird, in rot Zelllinien, für die hohe Apoptoseraten erwartet werden.

3.3 Korrelation: Apoptose bei primären Zellen vs. EBV-Derivaten

Um die für die Zelllinien erhobenen Daten mit den Daten für die primären Zellen aus dem AnnexinV-Assay zu korrelieren, wurden Diagramme erstellt, in denen jeweils auf der Abszisse für jede Probe der Anteil an apoptotischen primären Zellen im AnnexinV-Assay aufgetragen wurden. Auf der Ordinate wurden dann entsprechend für die korrespondierende Zelllinie der ermittelte Wert der Messung der hypodiploiden Zellfraktion bzw. der Detektion von Caspasen durch Nachweis eines Caspase-Inhibitors aufgetragen. In Abb. 3.3 sind exemplarisch die Diagramme für den Vergleich zwischen den Ergebnissen für die Messungen im AnnexinV-Assay in den primären Lymphozyten nach einer Behandlung mit 0,4 Gy mit den Ergebnissen der Detektion von Caspasen in den entsprechenden Zelllinien zum Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy (Abbildung 3.3A) bzw. 12 Gy (3.3B) in den Proben des KORA Kollektivs dargestellt.

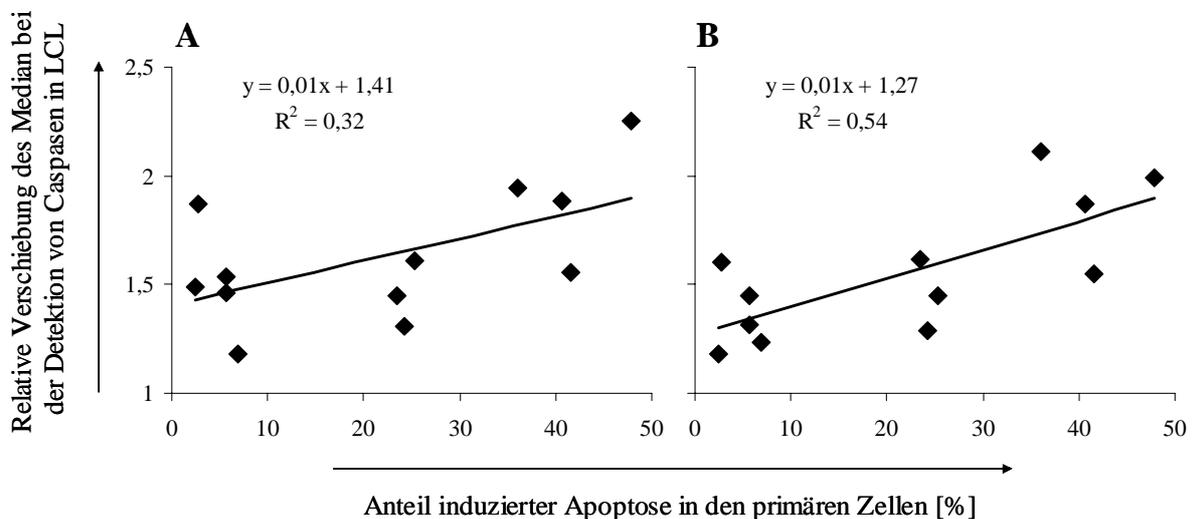


Abbildung 3.3: Exemplarischer Vergleich der induzierten Apoptose in primären Lymphozyten aus dem KORA-Kollektiv und ihren korrespondierenden Zelllinien.

Auf der Abszisse ist der Anteil induzierter Apoptose in den primären Lymphozyten (in Prozent) nach Bestrahlung mit 0,4 Gy aufgetragen. Die Ordinate repräsentiert die relative Verschiebung des Median in der Detektion von Caspasen in den korrespondierenden Zelllinien. Jeder Wert entspricht also einem Probenpaar. Die durchgezogene Linie stellt jeweils die Trendlinie der Werte dar. Für diese Gerade kann die Gleichung ($y = m \cdot x + t$) bestimmt werden und damit die Steigung m dieser Gerade. Außerdem kann das Bestimmtheitsmaß R^2 der Korrelation sowie die Art der Korrelation ermittelt werden.

A: Auf der Ordinate sind die Werte der Medianverschiebung für den Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy aufgetragen. Die Steigung der Trendlinie beträgt $m = 0,01$, das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,32$, die Korrelation ist positiv.

B: Auf der Ordinate sind die Werte der Medianverschiebung für den Zeitpunkt 72 h nach Bestrahlung mit 12 Gy aufgetragen. Die Steigung der Trendlinie beträgt $m = 0,01$, das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,54$, die Korrelation ist positiv.

Durch die aufgetragenen Werte konnte eine Trendlinie gezogen werden, die durch die Geradengleichung $y = m \cdot x + t$ beschrieben werden kann. Außerdem kann für jeden Vergleich das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt werden. Es gibt an, in welchem Maß die Varianz einer Variablen durch die Varianz einer anderen Variablen bestimmt wird. Ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0$ bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht, ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 1$ sagt aus, dass ein exakter

linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht, also eine Korrelation von 100%. Ein weiterer wichtiger Parameter für den Vergleich von zwei Datensätzen ist die Art der Korrelation. Eine positive Korrelation bedeutet, dass die Zelllinien, die aus primären Zellen mit erhöhter strahleninduzierter Apoptose generiert worden sind, ebenfalls erhöhte Apoptose nach Bestrahlung aufwiesen, während eine negative Korrelation anzeigt, dass die aus primären Zellen mit erhöhter strahleninduzierter Apoptose hergestellten Linien gesenkte Apoptoseraten zeigen.

Der Vergleich zwischen jeweils zwei Parametern, im Beispiel die Anteile induzierter Apoptose in den primären Lymphozyten nach Bestrahlung mit 0,4 Gy und die relative Verschiebung des Median in der Detektion der Caspasen 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy (Abb. 3.3A) und mit 12 Gy (Abb. 3.3B), wurde für alle möglichen Parameter-Paarungen durchgeführt, die Werte für das Bestimmtheitsmaß sowie die Art der Korrelation sind für die Proben des KORA-Kollektivs in Tabelle 8.3.3 des Anhangs, für die Proben der LUCY-Kohorte in Tabelle 8.3.3/1 im Anhang zusammengefasst.

Der statistische Vergleich der Apoptose-Induktion zwischen primären und abgeleiteten EBV-immortalisierten Zelllinien ergab keine statistisch signifikante Korrelation. Bezogen auf das vorliegende Projekt bedeutete dies, dass die von phänotypisch auffälligen Primärzellen abgeleiteten EBV-Zelllinien zumindest den komplexen Phänotyp „Apoptose“ nach Bestrahlung nicht beibehalten haben. Es waren keine klaren Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennbar. Für die weitergehende Analyse der molekularen Ursachen der Strahlenempfindlichkeit bedeutete dies, dass die Analyse von Proteinexpression und -induktion in den EBV-Zelllinien möglicherweise – analog zur Situation der Apoptose – nicht die Situation der primären, strahlensensitiven Zellen widerspiegelt.

4. Molekulare Funktionsanalysen

4.1 Funktionale Analyse des Arg280His-Polymorphismus in XRCC1

Diese Thematik wurde nach einer beantragten und genehmigten inhaltlichen Änderung im Jahr 2006 in das Programm des Forschungsprojekts aufgenommen. Das Produkt des Gens XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*) ist einerseits an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt, die durch ionisierende Strahlung oder alkylierende Agenzien verursacht werden, andererseits aber auch an der Basenexzisions-Reparatur. Der Ausgangspunkt für die funktionelle Untersuchung dieses *single nucleotide polymorphism* (SNP) im XRCC1-Gen war eine an der Universität Göttingen (Abteilung Genetische Epidemiologie) durchgeführte statistische Analyse von Comet-Assay-Daten, welche am BfS (Fachbereich Strahlenschutz und Gesundheit) an Zellmaterial von jungen Lungentumor-Patienten (LUCY) gewonnen worden waren. Bei dieser statistischen Analyse zeigte sich, dass geringe Unterschiede im DNA-Reparaturverhalten nach Bestrahlung der Lymphozyten mit dem Allelstatus des SNPs Arg280His korrelieren.

Die beiden eingangs genannten Reparaturfunktionen von XRCC1 wurden daher mit zwei verschiedenen Assays untersucht. Der Assay zum Nachweis der XRCC1-vermittelten Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen macht sich die Tatsache zunutze, dass für bei dieser Aktivität NAD⁺ erzeugt wird. Es wurde daher die zelluläre Konzentration von NAD⁺ nach DNA-Schädigung durch Methylmethansulfonat (MMS) bzw. H₂O₂ oder nach ionisierender Bestrahlung gemessen (Protokoll im Anhang 8.4.1).

Die Anzahl der Zelllinien mit dem Allelstatus Arg/Arg, Arg/His bzw. His/His, die in den jeweiligen Versuchen zur Quantifizierung des NAD⁺ Gehalts nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Noxen eingesetzt wurden, ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. In diesem Versuch wurden ausschließlich Zelllinien, die aus Proben des LUCY-Kollektivs gewonnen wurden, sowie die interne Laborkontrollzelllinie SiMo, die homozygot Träger des häufigen Allels XRCC1 Arg280 ist, analysiert.

Tabelle 4.1: Anzahl der verwendeten Zelllinien im Versuch zur Quantifizierung des NAD[±] Gehalts nach Behandlung mit verschiedenen Noxen unter Angabe des Allelstatus bezüglich XRCC1 Arg280His.

Allelstatus	Anzahl der untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit		
	ionisierender Strahlung (Dosis 4 Gy)	H ₂ O ₂ (Dosis 100 mM)	Methylmethansulfonat (Dosis 1 mM)
Arg/Arg	2	2	4
Arg/His	3	3	5
His/His	1	0	2

Die Ergebnisse der Quantifizierung des NAD⁺-Gehalts konnten eine NAD⁺-Steigerung nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Noxen erfassen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Zelllinien mit unterschiedlichem Allelstatus von Arg280His festgestellt werden.

Als Alternative zur Untersuchung der Basenexzisions-Reparaturkapazität von XRCC1 wurde ein Assay etabliert, der sehr viel direkter die DNA-Reparatur – unabhängig von dem durch viele Variable beeinflussbaren NAD⁺-Gehalts – misst. Der Assay basiert auf einem doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid, das eine Fehlpaarung (Uracil) aufweist (Protokoll siehe Anhang 8.4.1/2). Dieses Oligonukleotid wird zu einem Zellextrakt der zu

untersuchenden Zelllinien gegeben, und für die Reparatur werden radioaktiv markierte Nukleotide eingesetzt.

Das Basenexzisions-Reparaturverhalten der unterschiedlichen Zelllinien zeigt, bezogen auf eine Kontrollzelllinie, ebenso kein eindeutiges Bild, das etwa auf eine Beeinträchtigung der Basenexzision-Reparatur in Trägern des SNPs Arg280His hinweist (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielen bei der Aktivität von XRCC1 auch bisher unbekannte Parameter der Zellen eine Rolle (z.B. die Zellzyklusphase in der sich die Zellen befinden). Für die Analyse der Basenexzisions-Reparaturkapazität wurden ausschließlich für eine der beiden Varianten homozygote Zelllinien verglichen, da hier der größtmögliche Unterschied zu erwarten war. Als Kontrollzelllinien wurden die für das häufige Allel homozygoten internen Laborkontrollzelllinien SiMo und DaSa verwendet, bei den untersuchten Zelllinien handelt es sich um eine Zelllinie aus Proben der LUCY-Kohorte sowie drei Zelllinien aus Proben des KORA-Kollektivs. Die relativ geringe Anzahl der Proben resultiert aus dem seltenen Auftreten des SNP Arg280His.

Insgesamt muss gefolgert werden, dass der Vorbefund der Korrelation eines SNP (Arg280His) im XRCC1-Gen mit veränderter DNA-Reparaturkapazität im Comet assay auf molekularer Ebene nicht nachgewiesen werden konnte.

5. Molekulare Analysen der auffälligen Proben

5.1 Kandidatenproteine für Strahlenempfindlichkeit

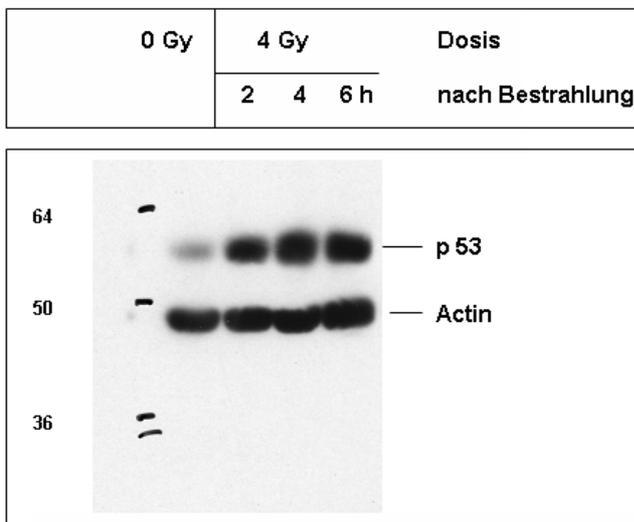
5.1.1. Grundlagen und Methodik

Als Kandidatenproteine für veränderte Strahlenempfindlichkeit kommen im Wesentlichen Proteine der DNA-Reparatur und des Apoptose-Signalweges in Frage, sowie weitere Proteine, für die in der Fachliteratur (auf Ebene der Proteine oder der jeweiligen Gene) Veränderungen im Zusammenhang mit Strahlenempfindlichkeit beschrieben wurden. Für unsere Studie wurden die Proteine p53, NBS1, TopoI, XRCC1, XRCC3, PALB-2, Cdc45, BRCA1, WRN, Chk1 zur weiteren Analyse ausgewählt.

5.1.2. Das p53-Protein

Das p53 Tumorsuppressor-Protein ist wesentlich bei der strahleninduzierten Apoptose beteiligt (Ohnishi T., The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia. J Cancer Res Ther. 2005 Jul-Sep;1(3):147-50. Review) Mehrere Stress-induzierte Signalketten münden in die Regulation von p53 als zentralen Bestandteil der Stressantwort ein, weshalb die Regulation von p53 einen „gemeinsamen Nenner“ der Strahlenantwort darstellen könnte, von dem aus z.B. Apoptose-Signale und Zellzyklus-Signale weitergeleitet werden.

Nach Bestrahlung wird eine Stabilisierung des p53 durch Phosphorylierung induziert, was in Western-Blot-Analysen als Anstieg der Gesamt-Proteinmenge (Induktion) sichtbar wird. Alternativ wurde das phosphorylierte p53 mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers detektiert (Daten nicht gezeigt).



In entsprechenden Vorversuchen konnte eine gute Induktion der Gesamtproteinmenge 2 - 6h nach Bestrahlung mit 4 Gy gefunden werden. Links ist ein typisches Experiment mit der Kontrollzelllinie BAB626 dargestellt, in welchem die Induktion des Gesamt-p53-Proteins der Expression des Haushaltsproteins Actin - als interner Standard - gegenübergestellt ist. Die Verwendung eines phospho-spezifischen p53-Antikörpers brachte keine verbesserten oder veränderten p53-Induktionsergebnisse (Daten nicht gezeigt), weshalb im weiteren die kostengünstigere Messung der Gesamtproteinmenge von p53 durchgeführt wurde.

Abb. 5.1.2: Induktion des p53-Proteins nach Bestrahlung, Detektion im Western Blot: Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der BALB626-Zelllinie wurden pro Spur aufgetragen und mit p53- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

Die p53-Banden der *Western blots* wurden nach einscannen quantifiziert (siehe Anhang 8.5.1.2), um einen Vergleich der p53-Induktionshöhe und -Kinetik zwischen den verschiedenen Zelllinien zu ermöglichen. In der Abbildung 5.1.2/1 sind die p53-Induktionsdaten verschiedener exemplarischer KORA-Zelllinien in Abhängigkeit vom Apoptoseverhalten der jeweiligen Primärzelllinie dargestellt. Im Diagramm sind die Experimente einer exemplarischen Versuchsreihe vergleichend gegenüber gestellt.

Unter den Proben mit hoher Apoptose war die Probe mit der höchsten p53-Induktion (Ep 59, nach 6h), in den Proben mit geringer Apoptose die 2 Proben mit der geringsten p53-Induktion (K85, K113) zu finden. Proben mit mittlerer Apoptoseinduktion zeigten intermediäre p53-Induktion. In den Gruppen mit extremen Apoptosewerten zeigten sich also auch die Proben mit extremen p53-Induktionswerten. Diese Korrelation war aber nicht konsistent in den einzelnen Gruppen gegeben. Außerdem hat sich in Wiederholungen der Versuchsreihe die Quantifizierung der p53-Induktion als nur mäßig reproduzierbar erwiesen.

Die Ergebnisse legen daher insgesamt nahe, dass keine eindeutige Korrelation zwischen p53-Induktion und Apoptoseverhalten vorhanden war. Wiederholungen der Experimente, auch mit frischen Zelllysaten, zeigten prinzipiell gleiche p53-Induktionsmuster, aber unterschiedliche p53-Induktionshöhen, weshalb eine generelle Aussage zur p53-Induktion und dem damit evtl. gekoppelten Apoptoseverhalten nicht möglich war.

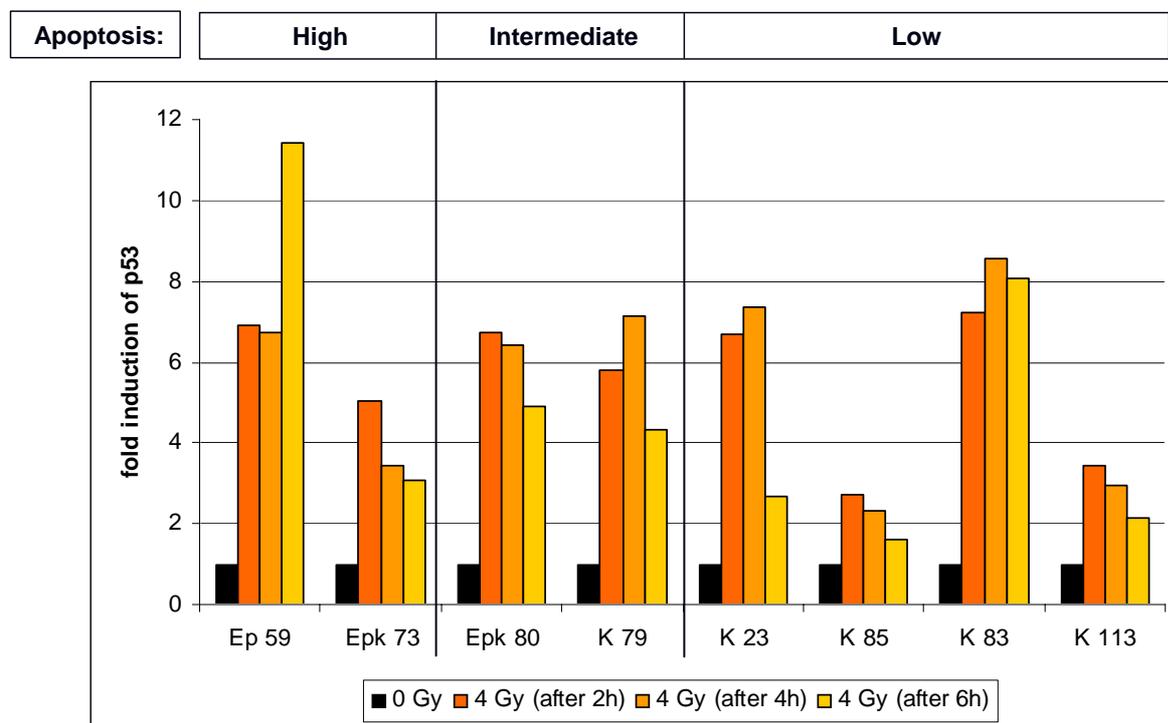


Abbildung 5.1.2/1: Induktion des p53-Proteingehalts nach Bestrahlung in KORA-Proben: Vergleich der Induktionen mit dem zellulären Apoptoseverhalten

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der entsprechenden KORA-Zelllinie wurden pro Spur aufgetragen und mit p53- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert. Nach Quantifizierung der p53-Signale, normiert auf die entsprechenden Actin-Kontrollen, wurde der Induktionsfaktor bestimmt und in Gruppen mit unterschiedlichem Apoptoseverhalten der korrespondierenden primären Zellen aufgetragen.

Die entsprechenden Experimente erbrachten bei den LUCY-Zelllinien prinzipiell dasselbe Ergebnis: Die Induktion des p53-Proteins konnte nach Bestrahlung immer sauber detektiert werden. Die Induktionshöhe und -kinetik korrelierte jedoch nicht eindeutig mit der zellulären Sensitivität der korrespondierenden primären Zellen. Diese molekulare Tatsache entspricht den in Kapitel 3.2 und 3.3 gezeigten zellulären Daten, die nahe legen, dass das Apoptoseverhalten der EBV-immortalisierten Zellen keine signifikanten und reproduzierbaren Unterschiede zeigt.

Darüber hinaus entspricht das Apoptoseverhalten der EBV-immortalisierten Derivate nicht mehr dem Verhalten der primären Ausgangszellen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die p53-Induktion als molekulare Strahlenreaktion in den EBV-Zelllinien kein zuverlässiger Parameter der zellulären Strahlenreaktion der korrespondierenden primären Zellen darstellt.

5.1.3. Das Nbs1-Protein („Nibrin“)

Patienten des Nijmegen Breakage-Syndroms (NBS) sind u.a. charakterisiert durch stark erhöhte Strahlenempfindlichkeit und ein erhöhtes Krebsrisiko. Das zugrunde liegende Nbs1-Protein, Nibrin, lagert sich – zusammen mit dem Atm-Protein – sehr schnell an DNA-Schäden an und wird als sehr übergeordnetes, frühes Protein der DNA-Schadensantwort angesehen (Kondratenko I, Paschenko O, Polyakov A, Bologov A. Nijmegen breakage syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:61-7.Review). Insbesondere soll seine Aktivität über das Einschlagen verschiedener DNA-Reparaturwege entscheiden. Neuere Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass es in Apoptosesignalwegen eine Rolle spielt.

Die Western-Analysen der immortalisierten Zelllinien mit einem Nbs1-Antikörper haben ergeben, dass Nbs1 – wie auch in primären Zellen - sehr schwach exprimiert erscheint. Eine Regulation nach Bestrahlung (Abb.5.1.3) konnte nicht gefunden werden. Unter Verwendung der verschiedenen Zellextrakte konnte in der Regel kein gut quantifizierbarer Western Blot erstellt werden, der Aussagen zu reduzierter Nbs1-Proteinmenge erlaubt. Es konnte in den getesteten Zellextrakten kein ungewöhnliches Spaltprodukt des Nbs1-Proteins detektiert werden, was auf eine Mutation oder den spezifischen Abbau des Proteins schließen ließe (nicht gezeigt). Dies korreliert mit der Tatsache, dass keine Veränderungen der NBS1-Sequenz in den Zelllinien gefunden wurden.

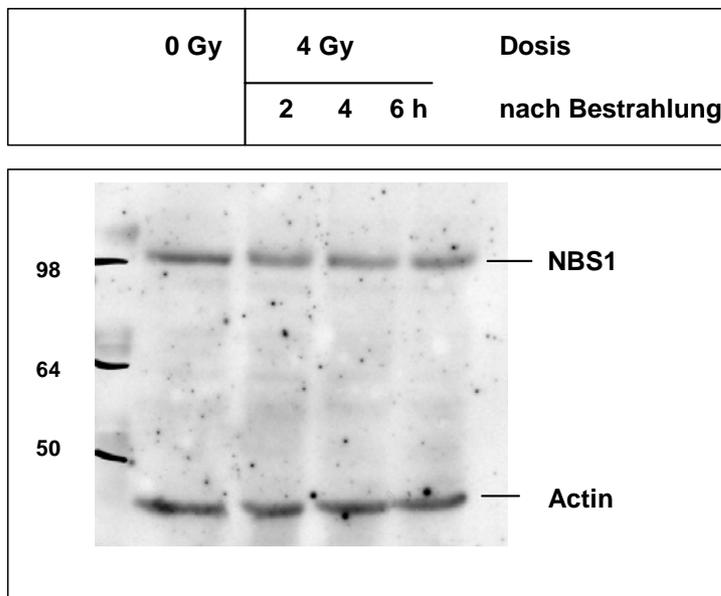


Abbildung 5.1.3 Detektion von Nibrin in immortalisierten Kontrollzellen
Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten Standardkontrolle wurden pro Spur aufgetragen und mit NBS1- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

5.1.4 Topoisomerase I

Die DNA-Topoisomerase I ist an wesentlichen Prozessen des DNA-Metabolismus als essentielles Protein beteiligt, so z.B. an der Transkription und DNA-Replikation. Das transiente, kovalente Binden der Topoisomerase I an die DNA wurde als Mechanismus bei der (stress-induzierten) Apoptose beschrieben (Rockstroh A, Kleinert A, Kramer M, Grosse F, Sørensen K. Cellular stress triggers the human topoisomerase I damage response independently of DNA damage in a p53 controlled manner. *Oncogene*. 2007 Jan 4;26(1):123-31. Epub 2006 Jun 26).

Die Untersuchung der TopoI-Mengen in den Zelllinien erbrachte für die KORA-Zelllinie K69 zunächst eine drastisch reduzierte Proteinmenge (Abb. 5.1.4). Gleichzeitig replizierten die entsprechenden Zellen außerordentlich schlecht, was mit der essentiellen Rolle von TopoI und dem beschriebenen Phänotyp TypI-Topoisomerase-defekter eukaryotischer Zellen im Einklang steht.

In weiteren Kontrollexperimenten wurde anhand der Actin-Kontrollen eine reduzierte Extraktmenge dieses Zell-Lysats als Ursache angesehen. Da die Zellen nicht weiter replizierten, mussten neue Extrakte aus einem neu aufgetauten Zell-Batch isoliert werden, welches dann besser replizierte und ein – wenn auch reduziertes – TopoI-Signal im *Western blot* ergab. Abschließend ist nicht völlig geklärt, ob hier eine Mutation der TopoI in einem *batch* vorlag, welche mit reduzierter Proliferationskapazität der Zellen einhergeht. Bezogen auf das vorliegende Gesamtprojekt würde eine (mögliche) TopoisomeraseI-Defizienz mit reduzierter Apoptose einhergehen. Veränderte (zB trunkierte) DNA-TopoisomeraseI-Proteine wurden nicht entdeckt.

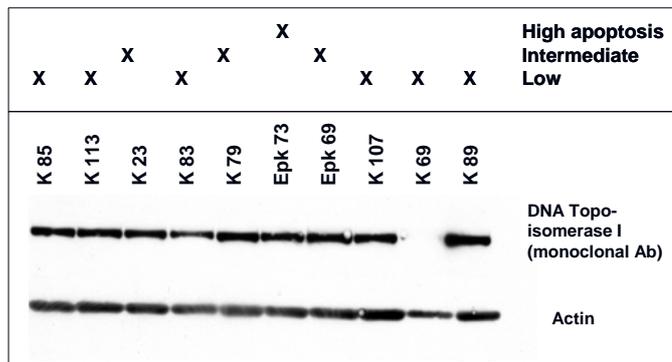


Abb. 5.1.4: Topoisomerase I-Detektion in KORA-Zelllinien

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten KORA-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit Topoisomerase I- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert. Die Apoptoseinduktion der entsprechenden primären Zellen ist angezeigt. Die deutlich reduzierte Topoisomerase I-Menge in der schlecht replizierenden K69-Zelllinie war nicht zufriedenstellend reproduzierbar.

Eine Gegenüberstellung der TopoI-Proteinmengen mit dem Apoptoseverhalten der LUCY-Zellen ist in Abb. 5.1.4/1 gezeigt. Basierend auf den Actin-Kontrollen und wiederholten Experimenten waren hier keine Auffälligkeiten in der Expressionsstärke oder in der Größe des Proteins (Bandenmuster) erkennbar. Lediglich die LUCY-Zelllinie 4047 war auffällig und zeigte eine außergewöhnlich hohe TopoI-Expression.

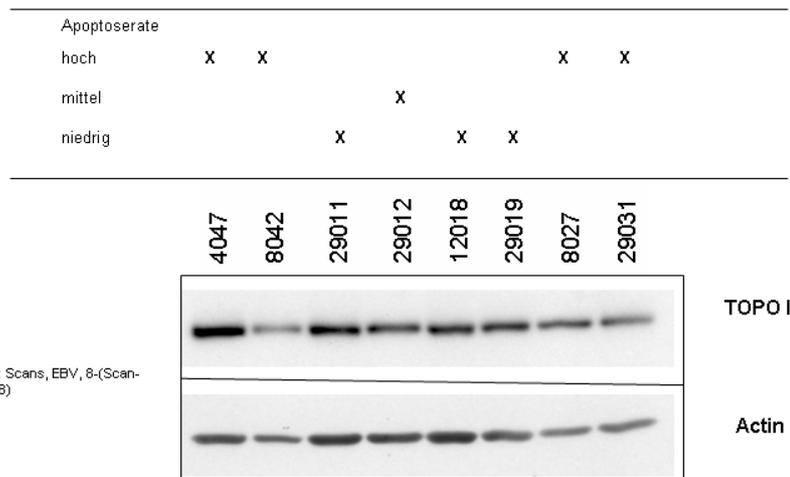


Abb. 5.1.4/1: TopoisomeraseI-Detektion in LUCY-Zelllinien

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit TopoisomeraseI- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert. Die Apoptoseinduktion der entsprechenden primären Zellen ist angezeigt.

5.1.5. XRCC1

Wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben, ist das Xrcc1-Protein an der Reparatur von (strahleninduzierten) DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt (Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. DNA Repair (Amst). 2004 Aug-Sep;3(8-9):1081-90. Review). Eine Analyse des Xrcc1-Proteins in den Extrakten der immortalisierten Zellen war durch die geringe Qualität des verwendeten Antikörpers erschwert. Die relevante Proteinbande mit der Größe von 70 kDa war von einer Bande höheren Molekulargewichts sowie mehreren kleineren Banden begleitet (Abb. 5.1.5). Die Analyse der Extrakte mehrerer KORA-Zelllinien erbrachte keine Auffälligkeiten der Xrcc1-Bande, die mit dem Apoptoseverhalten der Zellen korrelierte.

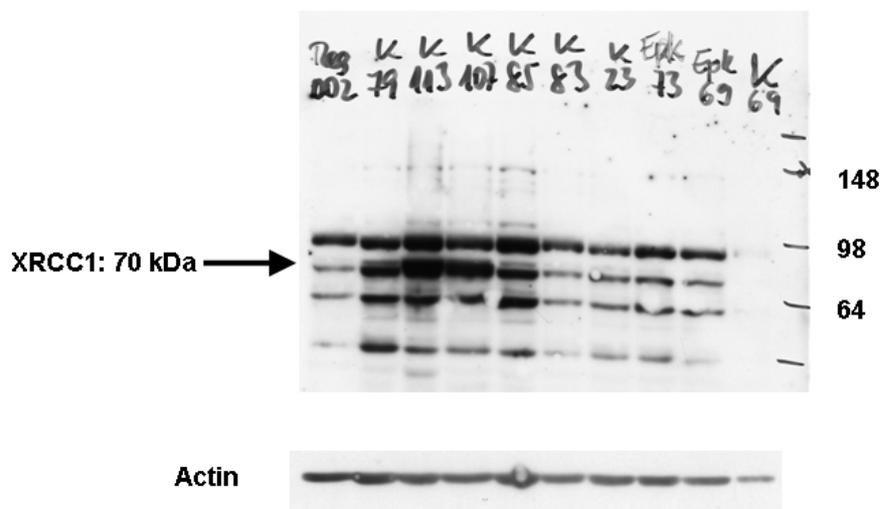


Abb. 5.1.5: Detektion des Xrcc1-Proteins in KORA-Zelllinien

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten KORA-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit Xrcc1- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

Allerdings war das Fehlen der Xrcc1-Bande(n) in K69 auffällig, die auch trotz leicht reduzierter Proteinmenge (siehe Actin-Ladekontrolle) zumindest deutlich reduziert erscheint. In Sequenzanalysen geht dies mit einem heterozygoten SNP in XRCC1 einher (siehe Kapitel 5.2.9). Basierend auf der schlechten Qualität des verwendeten Antikörpers erscheint eine abschließende Aussage zur Xrcc1-Expression in K69 verfrüht.

Auch in den Extrakten der LUCY-Zellen konnte keine Korrelation mit deren Apoptoseverhalten aufgedeckt werden (Abb. 5.1.5/1).

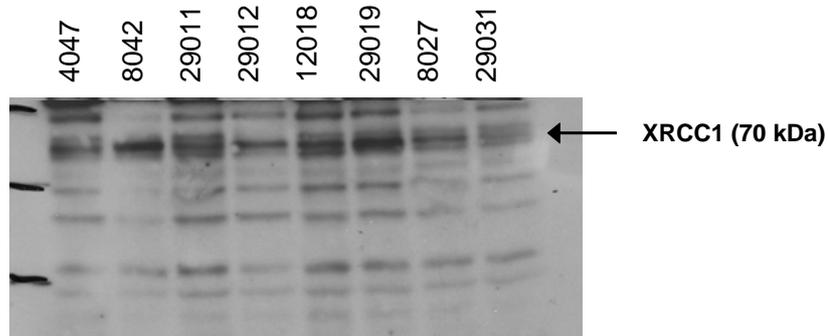


Abb. 5.1.5/1: Detektion des Xrcc1-Proteins in LUCY-Zelllinien
Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit Xrcc1- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

5.1.6. PALB-2

Wie im Abschnitt 5.2.7 beschrieben, ist das PALB-2-Protein an der Regulation der DNA-Reparatur beteiligt (Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. Nat Rev Genet. 2007 Oct;8(10):735-48. Epub 2007 Sep 4. Review). Die relevante Proteinbande mit der Größe von 140 kDa (Abb. 5.1.5) war von mehreren Banden geringeren Molekulargewichts begleitet (nicht gezeigt). Es konnte in den KORA- und LUCY-Zelllinien keine Defizienz in PALB2-detektiert werden. Auffällig mag lediglich sein, dass die LUCY-Zelllinie (4047) mit einer homozygoten PALB2-Mutation (Abschnitt 5.2.7) sich durch recht hohe Expression auszeichnet.

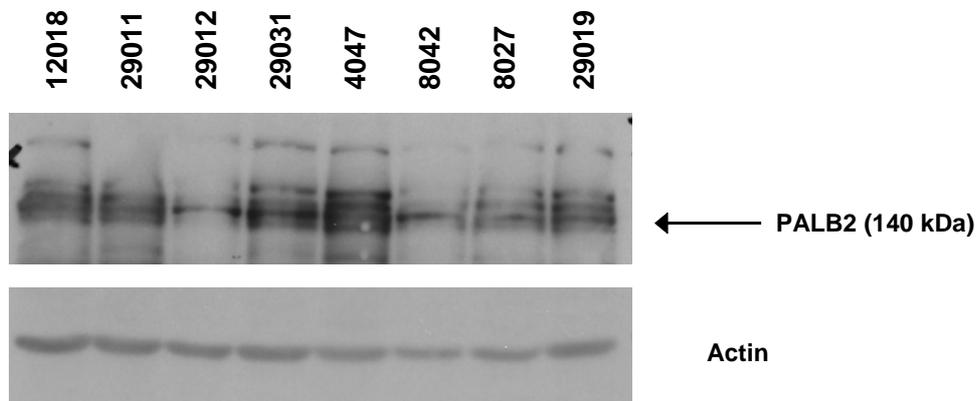


Abb. 5.1.6: Detektion des PALB-2-Proteins in KORA-Zelllinien
Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit Palb2- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

5.1.7. Cdc45

Das Cdc45-Protein kann als Schlüsselkomponente der Zellzyklusregulation an der Ausprägung der Apoptose und der Krebsentstehung beteiligt sein (Pollok S, Stoepel J, Bauerschmidt C, Kremmer E, Nasheuer HP. Regulation of eukaryotic DNA replication at the initiation step. Biochem Soc Trans. 2003 Feb;31(Pt 1):266-9. Review). In Pilotexperimenten wurde dieses Protein in den Extrakten der immortalisierten Zelllinien getestet. Es zeigte sich, dass der verwendete Antikörper eine sehr gute Spezifität aufwies (Abbildung 5.1.7), in den LUCY-Zelllinien (s.u., exemplarisch) und den KORA-Zelllinien (nicht gezeigt) jedoch keine Auffälligkeiten erbrachte.

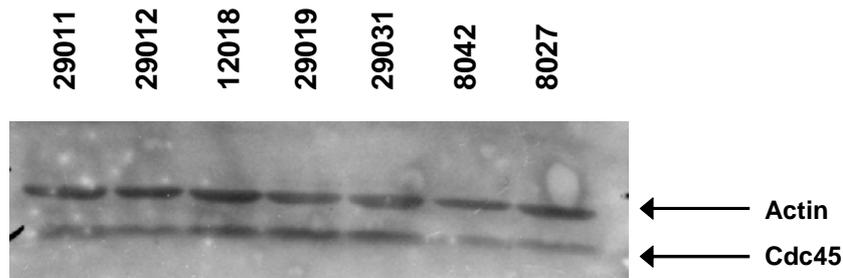


Abb. 5.1.7: Detektion des Cdc45-Proteins in LUCY-Zelllinien

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit Palb2- und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

5.1.8. Chk1

Das Chk1-Protein ist als direktes Zielprotein Atm/Nbs-abhängiger Signalkaskaden an der Regulation der Strahlenantwort beteiligt (Chen Y, Poon RY. The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. Front Biosci. 2008 May 1;13:5016-29. Review). In Pilotexperimenten wurde dieses Protein in den Extrakten der immortalisierten Zelllinien getestet. Es zeigte sich, dass der verwendete phospho-spezifische Antikörper eine sehr gute Spezifität aufwies (Abbildung 5.1.8).

Chk1 wird im Rahmen der Strahlenantwort phosphoryliert, was als entsprechende, leichte Zunahme des phospho-Chk1 in 5.1.8 sichtbar wird. Es konnte in den LUCY-Zelllinien (s.u., exemplarisch) und den KORA-Zelllinien (nicht gezeigt) jedoch keine Auffälligkeiten bzgl. des Chk1-Proteins gefunden werden.

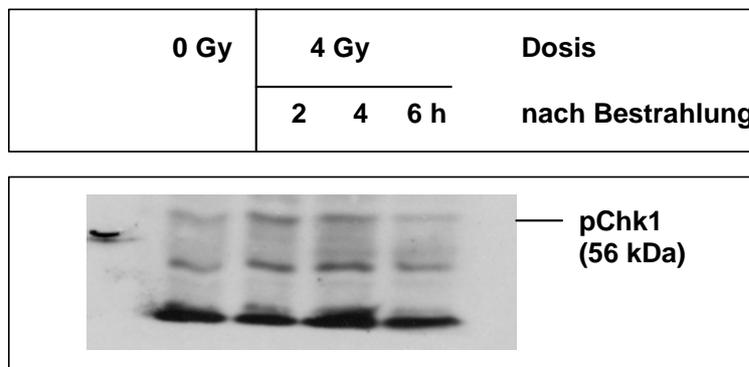


Abb. 5.1.8: Detektion des phosphorylierten Chk1-Proteins in LUCY-Zelllinie 8027

Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinie 8027 wurden pro Spur aufgetragen und mit einem phospho-spezifischen Chk1-Antikörper und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

5.1.9. WRN

Die Werner-Helikase ist an rekombinativen Reparaturprozessen beteiligt (Ouyang KJ, Woo LL, Ellis NA. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. Mech Ageing Dev. 2008 Jul-Aug;129(7-8):425-40. Epub 2008 Mar 15. Review). Das Wrn-Protein war in den Zelllinien gut nachweisbar (Abb. 5.1.9). Interessanterweise zeigt die KORA-Zelllinie Epk69 eine reduzierte WRN-Proteinmenge. Diese Zelllinie trägt – als einzige – eine neue, homozygote Mutation im WRN-Gen. Möglicherweise trägt diese Mutation zu einer Destabilisierung des WRN-Proteins und damit zur reduzierten Proteinmenge bei.

Eine andere Zelllinie, K69, zeigte bereits eine reduzierte TopoisomeraseI-Menge (Wrn interagiert direkt mit TopoI), was jedoch in einer erneuten Extraktzubereitung nicht mehr bestätigt werden konnte. Auch bzgl. des Wrn-Proteins fällt diese Zelllinie auf, was jedoch im 2. Extrakt (ii) relativiert wird.

Die Zelllinie 8042 trägt 3 neue unbekannte WRN-Mutationen (siehe Kapitel 5.2.5), Auf Proteinebene scheint dies nicht zu einer Destabilisierung oder Fragmentierung des Proteins zu führen, die Gesamtproteinmenge ist unauffällig.

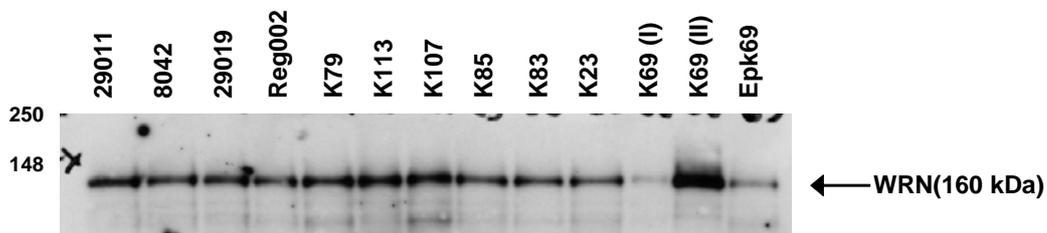


Abb. 5.1.9: Detektion des WRN-Proteins in LUCY-Zelllinien
Gesamtzellextrakte von 10^5 Zellen der immortalisierten LUCY-Zelllinien wurden pro Spur aufgetragen und mit einem phospho-spezifischen WRN-Antikörper und β -Actin-spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert. Die Actin-Ladekontrolle ist hier nicht dargestellt.

5.1.10. Interpretation

Die Analyse von Kandidaten-Proteinen der Strahlenempfindlichkeit hat nur wenige Aussagen zu möglichen Defizienzen in einzelnen Zelllinien ergeben. Die Analysen waren allerdings dadurch erschwert, dass in vielen Fällen die experimentellen Ergebnisse schwer interpretierbar waren. Wiederholungsexperimente verdeutlichten die unbefriedigende Reproduzierbarkeit der semi-quantitativen Darstellung der oft schwach exprimierten Proteine. Diese Tatsachen gründen im wesentlichen auf mehreren methodischen Problemen, so z.B. i) der ungenügenden Spezifität vieler Antikörper, ii) der Schwierigkeit der Standardisierung von Western blots, iii) der Schwierigkeit, von vielen verschiedenen Proben gleiche Proteinmengen aufzutragen, iv) der hohen Fehleranfälligkeit von Quantifizierungen. Kompliziert wurden diese Analysen weiterhin dadurch, dass die EBV-immortalisierten Zelllinien in einigen Fällen unterschiedliche Proliferationsvermögen im Laufe der Kultivierung zeigten, was sich wiederum auf die Expression mancher Proteine direkt auswirkt.

Zusammenfassend muss gesagt werden, daß die hier gezeigten Auffälligkeiten in der Proteinexpression durch weitere Experimente statistisch untermauert werden müssen. Andere Experimente im Rahmen dieses Projekts, die mit Antikörpern gegen BRCA-1, ATM, FancM und PARP durchgeführt wurden, wurden aufgrund fehlender Auffälligkeiten und schwacher Reproduzierbarkeit hier nicht vorgestellt und erläutert. Insgesamt betrachtet erscheint der Aufwand der Proteinanalysen unverhältnismäßig hoch zum potentiellen Ertrag der Ergebnisse, zumindest in dem hier vorliegenden Design der Studie.

5.2 Kandidatengene für Strahlenempfindlichkeit

5.2.1 Grundlagen und Methodik

Als Alternative zur Analyse von Proteinveränderungen in den auffälligen Proben wurden Kandidatengene der Strahlenempfindlichkeit auf DNA-Veränderungen (Mutationen) untersucht. Im Unterschied zur Proteinanalyse sollte dieser Ansatz prinzipiell unabhängig von verändernden Einflüssen der EBV-Immortalisierung sein. Die DNA-Sequenz, welche aus den cDNAs der EBV-immortalisierten Zellen gewonnen wird, sollte prinzipiell die Sequenz der primären Zellen widerspiegeln.

Die Strategie der DNA-Analyse sah vor, cDNA-Pools der einzelnen Zellproben zu sequenzieren. Bei diesem Ansatz bleiben intronische Sequenzen der genomischen DNA unberücksichtigt, es werden lediglich die kodierenden Sequenzen der Gene analysiert. Die Sequenzierungen von PCR-amplifizierten Pools der cDNAs minimiert die Wahrscheinlichkeit, potentielle Fehler der ersten Schritte in der Generierung der cDNAs, nämlich während der Umschreibung von mRNA zu cDNA und der ersten Amplifikation, als Sequenzdaten zu erfassen. Ein allgemeines Protokoll der Sequenzierung ist im Anhang (8.5.2) zu finden.

Die gewählte Sequenzierstrategie richtet sich primär nach der Erfassung seltener Mutationen, SNPs, usw. Da keine Einzelklone der amplifizierten cDNAs sequenziert wurden, ergibt die Sequenzierung also eine Aussage über die Konsensus-Sequenz potentiell unterschiedlicher Einzelklone. Ereignisse wie das Auftreten unterschiedlicher cDNA-Spezies eines Gens, z.B. durch alternatives Spleißen, können daher in der Regel nicht erfasst werden.

Die Sequenzierung von Kandidatengenem kann im vorgelegten Projekt natürlich nur punktuell bestimmte Gene erfassen, deren Funktion bekanntermaßen die Strahlenempfindlichkeit beeinflussen, oder die im Rahmen größerer SNP-Analysen mit Strahlenempfindlichkeit korrelierten. Eine Liste der ausgewählten Gene, deren Referenzsequenz und grobe Charakterisierung ist in Tabelle 5.2 dargestellt.

Tabelle 5.2 Liste der zur Sequenzierung ausgewählten Gene

Gen	Accession #	cDNA (bp)	Anzahl Codons	Genfunktion
ATM	NM_000051	9171	3057	DNA-Schadensantwort
NBS-1	NM_001024688	2019	673	DNA-Schadensantwort
BLM	NM_000057	4254	1418	DNA-Reparatur (Helikase)
WRN	NM_000553	4299	1433	DNA-Reparatur (Helikase)
p53	NM_000546	1182	394	DNA-Reparatur, Tumorigenese
PALB-2	NM_024675	3561	1187	BRCA-Interaktion; Tumorigenese
TGFβ-1	NM_000660	1173	391	Wachstumsfaktor
XRCC-1	NM_006297	1902	634	Basen-Exzisionsreparatur
XRCC-3	NM_005432	1041	347	DNA-Reparatur
OGG-1	NM_016821	1275	425	DNA-Reparatur

5.2.2 ATM (Ataxia telangiectasia)

Das Atm-Protein stellt- zusammen mit dem Nbs-Protein (Nibrin) - eine sehr frühe Komponente in der Erkennung und Prozessierung von strahleninduzierten DNA-Schäden dar (Lavin MF. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. Oncogene. 2007 Dec 10;26(56):7749-58. Review). Die von Atm/Nibrin gesteuerten Signalketten regulieren unterschiedliche zelluläre DNA-Schadensantworten wie DNA-Reparatur, Apoptose, Zellzyklusregulation. Der Ausfall oder die Fehlfunktion eines der Proteine führt zu drastischer Strahlenempfindlichkeit, genomischer Instabilität, erhöhter Tumorinzidenz und weiteren klinischen Befunden in seltenen Patienten mit genetischer ATM- oder NBS1-Defizienz.

Tabelle 5.2.2: Veränderungen der ATM-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
GGA zu AGA	Gly (G) zu Arg (R)	K79 heterozygot	
TGT zu TTT	Cys (C) zu Phe (F)	L4047 homozygot	
AAA zu AAC	Lys (K) zu Asn (N)	Epk69 heterozygot	
TTT zu TTC	Phe (F) silent	Ep59 heterozygot	rs1800055
ACT zu ACC	silent Thr (T)	K0815	
AAG zu AAA	silent Lys (K)	K0815 Homozygot	
CTT zu CCT	Leu (L) zu Pro (P)	K0815 homozygot	
TAT zu TGT	Tyr (Y) zu Cys (C)	Epk73 heterozygot	liegt im SNP 12788418
CTT zu TTT	Leu (L) zu Phe (F)	L29019 homozygot	rs1800058
AAA zu AGA	Lys (K) zu Arg (R)	K0815 heterozygot	
GAT a) zu GTT	Asp (D) a) zu Val (V)	Ep 60, P111, P112 heterozygot	a) rs1801673
b) zu AAT	b) zu Asn (N)	Epk 73, KORA 23, KORA 69, L29012 heterozygot	b) rs1801516
CAC zu CAT	His (H) silent	hetero: L29011, L29012, L29019	
GGA zu AGA	Gly (G) zu Arg (R)	Reg002 heterozygot	rs11212587
GTC zu ATC	Val (V) zu Ile (I)	KORA 69, heterozygot	rs 1800060
ACT zu AGT	Thr (T) zu Ser (S)	L29019 heterozygot	
TGGTTAG <u>GCTCG</u>	Übergang Exon 6 / 7	L29019 heterozygot	Durch diff. Splicing ?
	Übergang Exon 27 / 28	Epk69 heterozygote	Diff. Splicing? Es fehlt Exon 27 ?

Wie in Tabelle 5.2.2 ersichtlich, wurden 16 verschiedene Nukleotidveränderungen im ATM-Gen gefunden, von denen nur 6 bereits bekannte SNPs darstellen. Bei den restlichen 10 Veränderungen handelt es sich also um neue Mutationen, die als solche noch nicht beschrieben wurden. Da sie nur in jeweils einer Zelllinie auftreten und bisher nicht beschrieben wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um individuelle („private“) Mutationen, nicht um SNPs handelt. 5 der neuen Mutationen haben Aminosäure-Veränderungen zur Konsequenz, können also funktionell relevant sein. 2 davon liegen sogar homozygot vor.

Nur 4 der insgesamt gefundenen Mutationen stellen „stille“ Mutationen dar, die also keine Veränderung der kodierten Aminosäure bewirken. Interessanterweise wurden auch heterozygote Veränderungen der exonischen Anordnung der ATM-cDNAs (zwischen Exon 6 und 7; Exon 26 und 27) als heterozygote Sequenzen gefunden. Diese sollte auf

unterschiedlichen ATM-cDNA beruhen, die durch differentielles Spleißen entstanden sind. Beide potentiellen Spleiß-Isoformen sind bisher nicht beschrieben.

Betrachtet man die ATM-Mutationen in den Zellen, die als strahlenauffällig ausgewählt worden waren, so ergibt sich, dass die 2 bekannten SNPs mit mehrfachem Auftreten in den Zelllinien zufällig verteilt scheinen, also keine Korrelation mit der Strahlenempfindlichkeit der korrespondierenden Primärzellen auftritt.

Die neue, homozygote Mutation der LUCY-Zelllinie 4047 stammt aus primären Zellen mit hoher Apoptoseinduktion. Die anderen neuen Mutationen stammen aus Zellen mit niedriger (Thr zu Ser in L29019), mittlerer (Gly zu Arg in K79; Lys zu Asn in EpK69) und hoher (Tyr zu Cys in EpK73) Apoptoseinduktion der jeweiligen primären Zellen.

5.2.3 NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrom)

Das NBS1-Gen bzw. Nibrin wurde in seiner Funktion bereits zusammen mit dem ATM-Gen vorgestellt. In der Tabelle 5.2.3 sind die Mutationen des NBS1-Gens gezeigt, welche in den Zelllinien gefunden worden waren. Erstaunlicherweise sind im NBS1-Gen insgesamt sehr wenige genetische Veränderungen und keinerlei neue Mutationen/SNPs gefunden worden. Lediglich ein bereits bekannter SNP wurde in sehr vielen Zelllinien detektiert, der für einen Aminosäureaustausch kodiert. Als Kontrolle sind hier zusätzlich die 2 Zelllinien P111 und P112 dargestellt, welche als obligate Träger der NBS1-Gründermutation zur Etablierung und internen Kontrolle der Sequenzierstrategie mitgeführt worden waren.

Tabelle 5.2.3: Veränderungen der NBS1-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
GAG zu CAG	Glu (E) zu Gln (Q)	<u>homozygot CAG:</u> K0815, Epk69, K113, K83 <u>heterozygot</u> K85, K79, K23, K107, Reg002, L8042, L29012, <u>normal GAG:</u> Epk80, Epk73, Ep59, Ep60, K89, K69, L8027, L4047, L29031, L29019, L29011, L12018	rs1805794
CAA zu CTA A CAA A del.	138 Gln (Q) zu Leu (L) 137, 138, 139	P 111 heterozygot P 112 homozygot	Gründermutation 657del5, Exon 6

Betrachtet man die Verteilung des entdeckten SNPs in Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit der korrespondierenden primären Zellen, so zeigt sich, dass in der KORA-Kohorte sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten SNP-Träger von primären Zellen mit mittlerer oder niedriger Apoptose stammen. Keiner der 7 Fälle stammt aus einer primären KORA-Zelllinie mit hoher Apoptoseinduktion. Es scheint also, zumindest in diesem kleinen KORA-Kollektiv, eine Korrelation des SNP mit mittlerer oder geringer Apoptoseinduktion (geringe Strahlenempfindlichkeit) vorzuliegen.

In der LUCY-Kohorte sind 3 Zelllinien betroffen, deren primäre Zellen hohe, mittlere und niedrige Apoptoseinduktion aufweisen. In diesem Kollektiv tritt also, im Unterschied zum KORA-Kollektiv, keine Korrelation des SNP mit Strahlenempfindlichkeit auf.

5.2.4 BLM (Blooms Syndrom)

Das BLM-Gen kodiert eine Helikase, die zusammen mit TypI-Topoisomerasen an rekombinativen Vorgängen der DNA-Reparatur beteiligt ist (Ouyang KJ, Woo LL, Ellis NA. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. Mech Ageing Dev. 2008 Jul-Aug;129(7-8):425-40. Epub 2008 Mar 15. Review). Patienten mit BLM-Defekten sind (leicht) überempfindlich gegenüber DNA-schädigenden Agenzien und zeigen genomische Instabilität. Die BLM-Helikase wie auch die Sequenz- und funktions-verwandte WRN-Helikase wirken darüber hinaus in vielfältigen Aspekten des zellulären DNA-Metabolismus.

In Tabelle 5.2.4 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Auffällig ist hier, dass ausschließlich bereits bekannte SNPs gefunden wurden, die darüber hinaus alle im heterozygoten Zustand auftreten. 3 der SNPs sind stille Mutationen und führen nicht zu Aminosäure-Veränderungen.

Tabelle 5.2.4: Veränderungen der BLM-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekante SNPs
CCT zu CTT	Pro (P) zu Leu (L)	K23, K83 (alle heterozygot)	rs11852361
ACG zu ACA	silent Thr (T)	Epk69, Epk73, Epk80, K83, K85, L29031, L4047, L8027 (alle heterozygot)	rs2227933
GCC zu GCA	silent Ala (A)	Epk69, Epk73, Epk80, K83, K85, L29031, L4047, L8027 (alle heterozygot)	rs2227934
CTC zu CTT	silent Leu (L)	Epk73, Epk80, K83, K85, L12018, L8027 (alle heterozygot)	rs1063147
GTA zu ATA	Val (V) zu Ile (I)	L29012, Ep60 (alle heterozygot)	rs7167216

Betrachtet man die Verteilung des entdeckten SNPs in Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit der korrespondierenden primären Zellen, so zeigt sich dass diese mehr oder weniger zufallsgemäß über alle betroffenen Zelllinien verteilt sind. Eine Korrelation mit der Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen primären Zellen ist nicht ersichtlich.

5.2.5 WRN (Werner Syndrom)

Das WRN-Gen kodiert ebenfalls für eine Helikase, seine Funktion wurde zusammen mit dem BLM-Gen dargestellt.

In Tabelle 5.2.5 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Es wurden 6 bereits bekannte SNPs in mehreren Zelllinien gefunden. Darüber hinaus wurden 5 neue Mutationen entdeckt, die jeweils nur in einer Zelllinie auftraten, wahrscheinlich also als „private“ Mutation der jeweiligen Individuen zu werten sind. Alle neuen Mutationen führen zu Veränderungen einer Aminosäure und könnten daher funktionell relevant sein.

Betrachtet man die Verteilung der 5 neuen Mutationen, so fällt auf, dass 3 davon in Lungentumorzelllinien mit hoher Apoptoseinduktion der jeweiligen Primärzellen auftraten. Eine neue Mutation trat im homozygoten Zustand in einer Zelllinie mit mittlerer Apoptoseinduktion der Primärzellen auf. Die bekannten SNPs waren mehr oder weniger zufällig in den verschiedenen Apoptosekategorien verteilt. Eine Korrelation der SNPs mit Strahlenempfindlichkeit erscheint unwahrscheinlich.

Tabelle 5.2.5: Veränderungen der WRN-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
GTT zu ATT	Val (V) zu Ile (I)	K107 heterozygot	rs2230009
TGT zu TGC	silent Cys (C)	K23, K85, K107, K79, L29012, L29019, L29031, Reg002 heterozygot K69, L8042 homozygot	rs1800389
AAA zu AGA	Lys (K) zu Arg (R)	L29019 heterozygot	
AGA zu ATA	Arg (R) zu Ile (I)	Epk69 homozygot	
GAT zu AAT	Asp (D) zu Asn (N)	L8042 heterozygot	
TTC zu CTC	Phe (F) zu Leu (L)	L8042 heterozygot	
ACT zu ATT	Thr (T) zu Ile (I)	L8042 heterozygot	
ACA zu ATA	Thr (T) zu Ile (I)	Ep60, Epk73, K85, L29019, homozygot Epk80, K113, K23, K69, Reg002, K83, L29012, heterozygot	rs17847568
TTG zu TTT	Leu (L) zu Phe (F)	K0815, Epk80, K23 heterozygot	rs1801195
AGC zu AGT	silent Ser (S)	K0815, Ep59, K69, K83, K89, L12018, L29011, L29012, L4047, L8027, L8042, heterozygot	rs1801196 = rs4987035
TGT zu CGT	Cys (C) zu Arg (R)	Epk69, K107, L12018, L8042 heterozygot K23, L29031, Reg002, K79 (?) homozygot	rs1346044

5.2.6 p53

Das p53-Gen kodiert für ein Tumorsuppressor-Protein, welches in vielen Tumorentitäten mutiert vorgefunden wird. Insbesondere tragen auch Zellen von jungen Lungentumor-Patienten extrem häufig inaktivierende p53-Mutationen. Das p53-Protein ist als Signalprotein an der Regulation der Apoptose, der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der neoplastischen Entartung der Zellen beteiligt.

In Tabelle 5.2.6 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Überraschenderweise wurden nur 2 Mutationen in den Zelllinien entdeckt. Eine davon, ein heterozygoter, bereits bekannter SNP ohne Aminosäureaustausch, tritt in einer unauffälligen KORA-Zelllinie auf. Eine neue Mutation, die allerdings kurz nach der kodierenden Sequenz liegt, wurde ebenfalls in einer KORA-Zelllinie gefunden.

Die Tatsache, dass in den Zellen der jungen Lungentumor-Patienten keine p53-Mutationen gefunden wurden, deutet darauf hin, dass die Tumorentstehung nicht durch eine bereits genetisch bedingte p53-Mutation der Patienten, als genetische Prädisposition entstanden ist.

Tabelle 5.2.6: Veränderungen der p53-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
CGA zu CGG	silent Arg (R)	Epk80 heterozygot	rs1800372
	kurz nach Stop	K79	

5.2.7 PALB-2

Das PALB-2-Gen kodiert für ein Protein, welches mit dem Brustkrebsproteinen BRCA1 und -2 und den Fanconi Anämie-Proteinen (FANC) funktionell interagiert. Es ist daher Bestandteil eines Proteinkomplexes, vermutlich unterhalb von ATM/Nibrin, welches die Schadensantwort der DNA reguliert.

In Tabelle 5.2.7 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Drei bekannte SNPs wurden gefunden, die jeweils heterozygot in den Zellen vorliegen. Drei neue Veränderungen wurden entdeckt, davon betrifft eine den Übergang zwischen Exon 2 und Exon 3. Hier liegen wahrscheinlich unterschiedliche Spleißprodukte des PALB-2-Gens in den Zellen der Lungentumorzelllinie vor.

Eine neue stille Mutation wurde als vermutlich private Mutation heterozygot entdeckt, in einer Zelllinie, deren Primärzellen geringe Apoptose aufweisen. Der bekannte SNP rs152451 wurde je einmal in KORA- und LUCY-Zelllinien heterozygot entdeckt, die jeweiligen Primärzellen zeigen beide geringe Apoptoseinduktion.

Sehr interessant könnte die homozygot vorliegende Mutation der Lungentumorzelllinie L4047 sein, die einen Aminosäureaustausch bewirkt und somit von funktioneller Relevanz sein könnte. Die korrespondierenden Primärzellen sind durch hohe Apoptoseinduktion charakterisiert.

Tabelle 5.2.7: Veränderungen der PALB-2-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
	Grenze Exon 2 / 3	L8027	<i>Exon 2 fehlt?</i>
GGA zu GGG	Gly (G) silent	K89 heterozygot	
TTA zu TCA	Leu (L) zu Ser (S)	Reg002 heterozygot	rs45494092
GAC zu GAA	Asp (D) zu Glu (E)	L4047 homozygot	
CAA zu CGA	Gln (Q) zu Arg (R)	K81, L29011 heterozygot	rs152451
GTG zu ATG	Val (V) zu Met (M)	Epk80 heterozygot	rs45624036

5.2.8 TGFβ-1

Das TGFβ-1-Gen kodiert für einen Wachstumsfaktor, der u.a. die Proliferation und Differenzierung in vielen Zelltypen reguliert (Okunieff P, Chen Y, Maguire DJ, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. Cancer Metastasis Rev. 2008 Sep;27(3):363-74. Review). Seine Fehlregulation verursacht Apoptose und fördert neoplastische Transformation. In größeren SNP-Studien konnten Korrelationen von TGFβ-SNPs mit Strahlenempfindlichkeit gezeigt werden.

In Tabelle 5.2.8 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Es wurden 3 bekannte SNPs gefunden, von denen einer (rs1800470) in einer Vielzahl von Zelllinien heterozygot oder homozygot auftrat. Betrachtet man das Auftreten dieses SNP mit der Strahlenempfindlichkeit der zugrunde liegenden primären Zellen, so zeigt sich, dass der SNP rs1800470 in heterozygoter Form in Zelllinien mit mittlerer und niedriger Apoptose der jeweiligen KORA-Primärzellen, sowie bei allen Kategorien der Apoptoseinduktion bei Zelllinien der primären Lungentumorzelllinien auftritt. Homozygote SNP-Träger wurden nur bei Linien von Primärzellen mit hoher und mittlerer (KORA) bzw. mit hoher (LUCY) Apoptoseinduktion entdeckt. Es gibt also möglicherweise eine Korrelation mit hoher Apoptose.

Tabelle 5.2.8: Veränderungen der TGFβ-1-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
CCG zu CTG	Pro (P) zu Leu (L)	K69, K83, K107, K79, L29011, L8027, L8042, Reg002 Heterozygot Epk80, K23, L4047 homozygot	rs1800470, = rs1982073, = rs9282871
CGG zu CCG	Arg (R) zu Pro (P)	Reg002 heterozygot	rs1800471 (=9282871)
ACC zu ATC	Thr (T) zu Ile (I)	Epk69 heterozygot	rs1800472

5.2.9 XRCC-1

Das XRCC-1-Gen kodiert für ein Protein der Excisions-Reparatur. Es interagiert mit XRCC4, Aprataxin, Ligase-3 und -4 und anderen Proteinen in der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, die typischerweise durch oxidativen Stress und ionisierende Strahlung entstehen, sowie der Nukleotidexcisions-Reparatur. In größeren SNP-Studien konnte eine Korrelationen des SNP rs17852150 mit Strahlenempfindlichkeit gezeigt werden (Hu et al, 2001, *Carcinogenesis*).

In Tabelle 5.2.9 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Es wurden lediglich 2 bekannte SNPs gefunden, die allerdings in mehreren Zelllinien heterozygot auftraten. Ein SNP davon beschreibt eine stille Mutation, die nur in Lungentumorzelllinien gefunden wurde.

Betrachtet man das Auftreten der SNPs mit der Strahlenempfindlichkeit der zugrunde liegenden primären Zellen, so zeigt sich, dass der SNP rs17852150 sowohl bei KORA-Zelllinien mit hoher als auch niedriger Apoptoseinduktion der korrespondierenden Primärzellen auftrat, sowie bei der Leukämiezelllinie mit niedriger Apoptose der Primärzellen. Eine klare Korrelation mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit konnte bei den hier vorliegenden Proben nicht gezeigt werden.

Tabelle 5.2.9: Veränderungen der TGFβ-1-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
CGG zu CAG	Arg (R) zu Gln (Q)	Ep60, K69, Reg002 heterozygot	rs11553658 = rs25487
CAA zu CAG	Gln (Q) silent	L29012, L4047, L8027 heterozygot	rs17852150 = rs3547

5.2.10 XRCC-3

Das XRCC-3-Gen kodiert für ein Protein der Excisions-Reparatur und wurde bereits im Zusammenhang mit XRCC-1 beschrieben. Es interagiert mit RAD51 und dessen Paralogen in der Rekombinationsreparatur von DNA-Schäden.

In Tabelle 5.2.10 sind die gefundenen Mutationen zusammengefasst. Es wurden 2 bekannte SNPs gefunden, die in mehreren Zelllinien heterozygot oder homozygot auftraten. 2 neue SNPs wurden entdeckt, die aber vor dem Start-Codon liegen und somit keine Aminosäureveränderung verursachen.

Lediglich der bereits bekannte SNP rs861539 liegt in der kodierenden Sequenz und bedingt eine Aminosäureveränderung, die homozygot oder heterozygot auftrat. Dieser SNP trat verstärkt in einer Brustkrebs-Population auf (Kuschel et al, 2002, *Hum.Molec.Genet.*). In der hier vorliegenden Studie trat dieser SNP ausschliesslich in KORA-Kontrollzellen auf nicht in Lungentumorzelllinien. In den KORA-Zelllinien korrelierte das homozygote Auftreten mit mittlerer oder niedriger Apoptose der jeweiligen Primärzellen, das heterozygote Auftreten mit hoher Apoptose.

Tabelle 5.2.10: Veränderungen der TGFβ-1-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
CGG C/G AGG Exon 1	vor Start (Ende Exon1)	Ep60, K113, K23 heterozygot	
AGG_A/G T Ex 1 Ex 2	vor Start (Anfang Exon2)	K83, K107 homozygot	rs1799794 (rs34100926)
TGCAGAG/TT GCAAG	vor Start (Exon 3)	L29012 heterozygot	
ACT zu ATG	Thr (T) zu Met (M) (Exon 8)	Epk80 heterozygot K113, K23, K89 homozygot	rs861539

5.2.11 OGG-1

Das OGG-1-Gen kodiert für ein Protein der Excisions-Reparatur, welches 8-hydroxy-Guanin (8oxoG)-Schäden spezifisch entfernt. 8oxoG-Schäden entstehen durch reaktiven Sauerstoff, der auch durch ionisierende Strahlung als Nebenprodukt entstehen kann. In früheren Berichten konnte eine Mutations-Inaktivierung des OGG-1 Gens mit Krebsentstehung korreliert werden (Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, Vielh P, El Naggar AK, Oudard S, Boiteux S, Radicella JP. Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. Cancer Res. 2000 Sep 1;60(17):4740-4).

In Tabelle 5.2.11 sind die gefundenen Mutationen, die überraschenderweise ausschließlich in den Lungentumorzelllinien auftraten, zusammengefasst. Zusätzlich zu einem bekannten SNP, der im 5'-UTR-Bereich vor dem Startkodon liegt, wurden 3 neue heterozygote Mutationen gefunden, von denen 2 ebenfalls vor dem Startkodon liegen. Eine neue heterozygote Mutation mit Aminosäureveränderung wurde in der Zelllinie L4047 entdeckt, deren korrespondierende primäre Zellen sich durch hohe strahleninduzierte Apoptose auszeichnen.

Tabelle 5.2.11: Veränderungen der OGG-1-Gensequenz in den immortalisierten Zelllinien

Mutationen			
Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Zellen/ Zelllinien	bekannte SNPs
	5`-UTR (vor Start)	L29019 heterozygot	rs3218999
CCT C /T AGG	5`-UTR (vor Start)	L8042 heterozygot	
CCTC A/T GGAAAG	5`-UTR (vor Start)	L29011hetero	
AGT zu GGT	Ser (S) zu Gly (G)	L4047 hetero	

5.2.12 Interpretation

Die übergeordnete Analyse der DNA-Sequenzierungen ergibt mehrere interessante Punkte:

1. Im sehr großen ATM-Gen wurden 16 verschiedene Mutationen gefunden, im 5-mal kleineren NBS1 –Gen wurde nur ein bekannter SNP entdeckt. Diese Tatsache spricht gegen eine reine Zufallsverteilung der gefundenen Mutationshäufigkeiten jedes Gens. Es gibt also (auch beim Vergleich der anderen Sequenzierungen) keine definierte Mutationsrate pro Sequenzlänge, die im Schnitt bei allen hier sequenzierten Genen gefunden wird.
2. Der Vergleich ATM–NBS1 deutet darauf hin, dass eine Korrelation der Häufigkeit der in ATM gefundenen Veränderungen mit
 - a. funktionellen Veränderungen (Strahlenempfindlichkeit) der Zellen
 - b. und /oder dem Krankheitsbild der untersuchten Kollektive existieren könnte.
3. In Gewebe von Lungentumoren sind sehr häufig p53-Mutationen nachweisbar. Die Tatsache, dass in den peripheren Zellen der jungen Lungentumor-Patienten keine p53-Mutationen gefunden wurden, deutet darauf hin, dass die Tumorentstehung nicht durch eine bereits genetisch bedingte p53–Mutation der Patienten, als genetische Prädisposition entstanden ist.
4. Bei 3 bereits bekannten SNPs in den Genen für NBS1, TGFb-1, XRCC-3, die in mehreren der untersuchten Zelllinien auftraten, konnten Korrelationen mit der Strahlenempfindlichkeit der korrespondierenden Primärzellen erkannt werden. Diese sind natürlich statistisch, aufgrund der geringen Probenzahl, derzeit nicht belastbar. In weiterführenden Untersuchungen (SNP-Analysen) kann die Signifikanz dieser Korrelation geprüft werden.
5. Es wurden mehrere neue, auch homozygot vorhandene, Mutationen in den verschiedenen Genen entdeckt, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben und funktionell relevant sein könnten. Weiterführende funktionelle Studien sollten dies untermauern und zur Analyse der Genfunktion beitragen können.
6. In den Genen für ATM und PALB-2 wurden aufgrund heterozygoter Sequenzen nach Exongrenzen veränderte Exon-Zusammensetzungen aufgedeckt. Diese sollten verschiedene Genvarianten darstellen, die durch differentielles Spleißen entstanden sind. Bei beiden Genen ist derzeit wenig darüber bekannt, wie verschiedene Spleiß-Isoformen die Genaktivität beeinflussen. Interessanterweise hat eine sehr aktuelle Publikation die Regulation der NBS1-Aktivität durch differentielles Spleißen postuliert (Takei et al, 2008, Radiation Research). Durch Sequenzanalyse einzelner cDNA-Klone kann das Auftreten verschiedener Spleiß-Isoformen für die hier gefundenen Ereignisse verifiziert werden.
7. Das Auftreten neuer, bisher unbekannter Mutationen war in der Lungentumor-Kohorte über dreifach erhöht im Vergleich zur KORA-Kontrollkohorte. Es stellt sich daher die interessante Frage, ob diese erhöhte Mutationsfrequenz mit dem Tumorstatus der Patienten korreliert.

6. Korrelationen

6.1 Korrelation: molekulare Parameter - zelluläre Parameter

Wie bereits in Kapitel 2.4 erwähnt, war eine Korrelation der zellulären Parameter Apoptose und DNA-Reparatur (Comet Assay) nur auf Ebene der Gesamt-Kohorten erkennbar. Die LUCY-Kohorte zeigte - im Vergleich mit den KORA-Kontrollen - bei unauffälliger DNA-Reparatur eine erhöhte Apoptoseinduktion. Die Leukämiekohorte zeigte eine leicht reduzierte DNA-Reparatur bei gleichzeitig reduzierter Apoptoseinduktion.

Diese zellulären Parameter konnten in den immortalisierten Zelllinien mit den molekularen Sequenz-Parametern verglichen werden, allerdings nur zum Vergleich der LUCY- und KORA-Kohorten. Die Immortalisierung auffälliger Leukämieproben wurde aus dem Arbeitsprogramm genommen.

Beim Vergleich der Sequenzdaten der beiden Kohorten fällt auf, dass

- der NBS1-SNP (rs1805794) in den KORA-Kontrollen 3 mal homozygot und 4 mal heterozygot, in den LUCY-Proben aber nur 3 mal heterozygot auftrat.
- Der XRCC1-SNP (rs3547) nur in den LUCY-Proben 3 mal auftrat.
- Der XRCC3-SNP (rs861539) nur in den KORA-Proben 4 mal auftrat, davon 3-mal homozygot.
- Eine bisher unbekannte ATM-Mutation nur in den LUCY-Proben 3 mal heterozygot auftrat. Dies ist auch der einzige Fall, wo eine neue Mutation in mehr als einer Probe auftrat. Das alleinige Auftreten in LUCY-Proben legt die Vermutung nahe, dass die Mutation funktionell mit Lungentumoren korrelieren könnte.

Die oben genannten Sequenzkorrelationen zeigen nur SNPs oder Mutationen auf, wo mindestens 3 untersuchte Zelllinien betroffen sind. Die übrigen, neu gefundenen Mutationen traten dreifach häufiger im LUCY-Kollektive auf, im Vergleich zur KORA-Kohorte. Ob und in wieweit die Sequenzdaten kausal mit den zellulären, phänotypischen Daten verknüpft sind, bleibt derzeit unklar.

6.2 Korrelation: experimentelle Parameter – klinisch/epidemiologische Parameter

6.2.1: LUCY-Kohorte:

Bei den LUCY-Kohorten waren unter den Apoptose-sensitiven alle Individuen 48 Jahre alt und älter (1 Ausnahme); bei den Apoptose-resistenten waren alle 48 Jahre alt und jünger. 4 von 5 sensitiven Patienten hatten eine Chemotherapie in den letzten 4 Wochen vor Blutentnahme durchgemacht, bei den resistenten war es nur 1 von 3 Patienten.

Besonders auffällig ist ein Apoptose-sensitiver Patient, der deutlich jünger als die anderen war. Die immortalisierten Zellen dieses Patienten tragen neue, einzigartige homozygote Mutationen sowohl im ATM-Gen als auch im PALB-2-Gen. Auch eine neue heterozygote Mutation im OGG-1-Gen wurde entdeckt. Auf Proteinebene wurde eine außergewöhnlich hoher TopoI-Expression sichtbar. Hier scheint eine genetische Prädisposition für Strahlenempfindlichkeit und Tumorenstehung nahe liegend.

Der einzige Apoptose-sensitive Patient, der weitere Krebsfälle in der Familie hat, fällt durch 3 neue einzigartige, heterozygote Mutationen im WRN-Gen auf. Auch hier könnte eine genetische Prädisposition vorliegen.

6.2.2: KORA-Kohorte:

Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen durch eine Verzögerung in der Projektvereinbarung und im Datentransfer vom Institut für Epidemiologie des Helmholtz Zentrums München keine epidemiologischen Daten vor.

7. Zusammenfassung

KORA-Kollektiv:

In der KORA-Kohorte gab es wenige Proben, die entweder in der DNA-Reparatur oder in der Apoptoseinduktion nach Bestrahlung auffielen. Die Zellen der KORA-Kohorte verhielten sich phänotypisch insgesamt unauffällig. Auf genetischer Ebene traten nur 4 von 14 der neu gefundenen Mutationen in KORA-Proben auf, 3 davon als neue Mutationen im ATM-Gen. Eine klare Korrelation auffälliger genetischer Daten mit phänotypischen oder biochemischen Befunden ist nicht erkennbar.

LUCY-Kollektiv:

Bei der Ermittlung der DNA-Reparaturkapazitäten war die LUCY-Kohorte im Vergleich zur KORA-Kontrollkohorte bezüglich der Mittelwerte unauffällig, es traten jedoch deutlich stärkere Schwankungen der Einzelwerte, speziell nach 60 min Reparatur auf. Umgekehrt waren bei der Apoptoseinduktion keine starken individuellen Schwankungen sichtbar, der Mittelwert jedoch etwas erhöht verglichen zur KORA-Kohorte. Bei den einzelnen Proben gab es keine Fälle, die in beiden Kriterien auffällig waren. Zur Immortalisierung und weiteren Analyse wurden nur die Apoptose-auffälligen Proben verwendet. Eine der Proben mit hoher Apoptoseinduktion war durch eine neue, homozygote Mutation im ATM-Gen sowie eine neue, homozygote Mutation in PALB-2-Gen charakterisiert. Auch auf klinisch/epidemiologischer Ebene ist dieser Patient auffällig, da er mit Abstand den jüngsten Lungentumor-Patienten innerhalb der auffälligen Patienten darstellt.

Eine andere Probe mit hoher Apoptoseinduktion ist durch 3 neue heterozygote WRN-Mutationen gekennzeichnet. Dieser Patient hat als einziger unter den auffälligen Patienten andere Krebsfälle in der Familie, was auf genetischen Ursachen beruhen kann.

In beiden Fällen ist die funktionelle Relevanz der neuen Mutationen bisher nicht bewiesen. In weiteren Studien sollte es unter Zuhilfenahme der entsprechenden immortalisierten Zelllinien möglich sein, phänotypische Auswirkungen der Mutationen zu studieren. Prinzipiell kann spekuliert werden, dass die Analyse der strahlen-induzierten Apoptose tatsächlich auffällige Proben liefert, die möglicherweise auf genetische Mutationen zurückzuführen sind.

Aus zeitlichen Gründen wurden im vorliegenden Projekt Proben immortalisiert, die auffällig bzgl. strahlen-induzierter Apoptose waren. DNA-Reparatur-auffällige Proben konnten für weitere molekulare und biochemische Analysen nicht berücksichtigt werden. Inwieweit die Reparatur-auffälligen LUCY-Proben mit dem molekularen Bild der Patientenzellen und dem klinisch/epidemiologischen Bild der Strahlenempfindlichkeit korrelieren, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Leukämie-Kollektiv:

Insgesamt zeigte sich, dass die individuellen Proben ähnlich den LUCY-Proben bzgl. der DNA-Reparatur stärker streuten als im KORA-Kollektiv; der Mittelwert der DNA-Reparatur war leicht erniedrigt. In der Apoptoseinduktion waren die Mittelwerte deutlich erniedrigt im Vergleich zum KORA- und LUCY-Kollektiv.

Bei den Leukämieproben traten mehrere auffällige Proben mit veränderter DNA-Reparatur oder auffälliger Apoptoseinduktion auf. Nur eine Probe (Re108) war in beiden Kriterien auffällig. Auf epidemiologischer und klinischer Ebene war dieser Patient, insbesondere auch bei der akuten Strahlenreaktion, allerdings absolut unauffällig.

Eine weitere Probe (Mü73) mit deutlich reduzierter Apoptose geht auf einen Patienten zurück, der klinisch außergewöhnlich empfindlich auf die Bestrahlung (Konditionierung) reagiert hatte: Der Patient zeigte bei einer geringen Gesamtdosis von 4 Gy starke Hautreaktionen und die stärkste Gesamtbeeinträchtigung (Karnovsky-Index) unter den untersuchten Patienten dieses Kollektivs. Andere Korrelationen zwischen experimentellen

und klinischen Daten konnten nicht erkannt werden. Eine Gesamtauswertung nach klinischen Kriterien steht aufgrund der verspäteten Probenrekrutierung noch aus.

Da das Ethikvotum für dieses Kollektiv eine molekulare Analyse der Zellen zunächst nicht vorsah, konnten diese Proben auf molekularer Ebene (noch) nicht weiter untersucht werden.

Überblick:

Die Studie hat gezeigt, dass

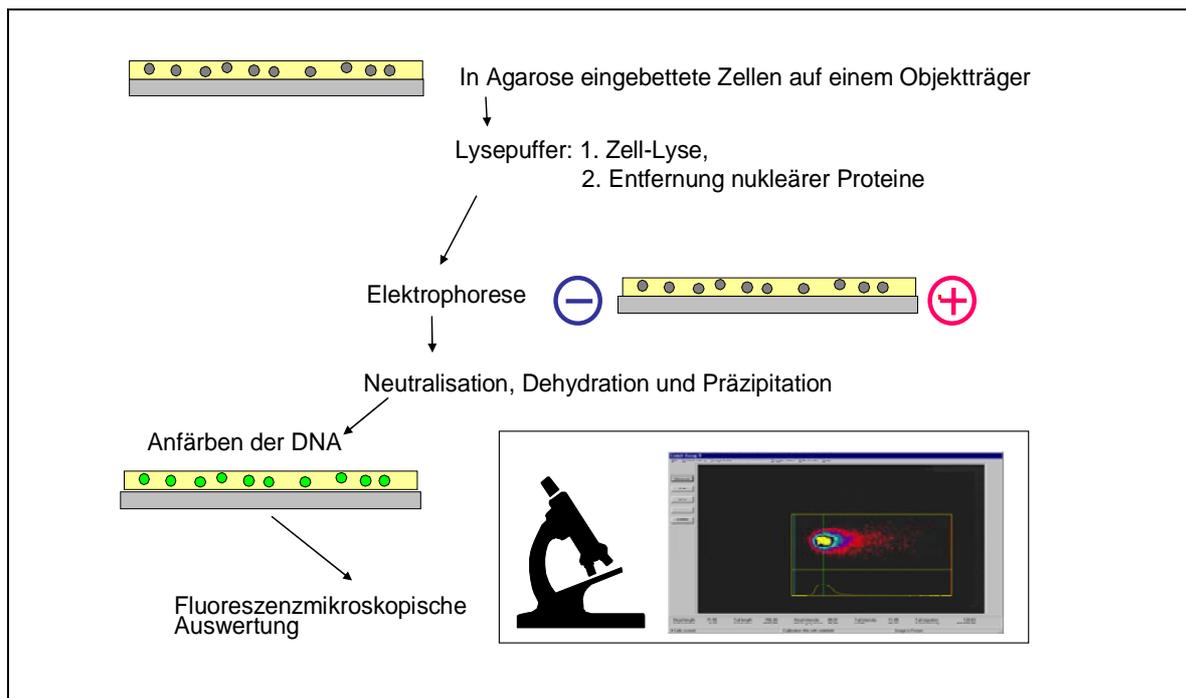
- sich die Kollektive der Lungentumor- und Leukämiepatienten phänotypisch bzgl. der Strahlenreaktionen vom Kontrollkollektiv (KORA) unterscheiden;
- unter den experimentell auffälligen Proben auch solche sind, die auf klinisch auffällige Patienten zurückgehen; eine klare 1:1-Korrelation ist jedoch keinesfalls gegeben;
- unter den auffälligen Proben neue Mutationen in Kandidatengen gefunden wurden, die ursächlich zur Strahlenempfindlichkeit beitragen können;
- innerhalb der Lungentumor-Kohorte mehr neue Mutationen auftraten als in der Kontrollkohorte (KORA)

8. Anhang

8.2.2.3 Methode: Comet-Assay

Vor der Durchführung des Assays werden zunächst Objektträger mit einer Schicht Agarose überzogen. Die zu untersuchenden Zellen werden mit flüssiger Agarose gemischt und als zweite Schicht auf die Objektträger aufgebracht. Nach dem Aushärten werden die Objektträger nacheinander in zwei verschiedene Lysepuffer gestellt, welche die Zellen lysieren bzw. nukleäre Proteine entfernen. Danach kann die Elektrophorese erfolgen, indem die Objektträger in eine Wanne mit alkalischem Laufpuffer überführt werden und ein elektrisches Feld angelegt wird. Als Vorbereitung der DNA-Färbung folgen Schritte der Neutralisation, Dehydratation und Präzipitation. Die rehydrierten Objektträger können dann getrocknet für die später folgende Färbung aufbewahrt werden. Nach der Färbung der DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green müssen die Objektträger sofort im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dabei wurden zunächst per Auge auf jedem Objektträger 50 Zellen ausgewählt. Die Analyse erfolgte dann in Jena mit der Software KOMET 4.0 (Vision Science) und in München mit VisCOMET, Version 1.2, (T.I.L.L. Photonics GmbH & Impuls GmbH).

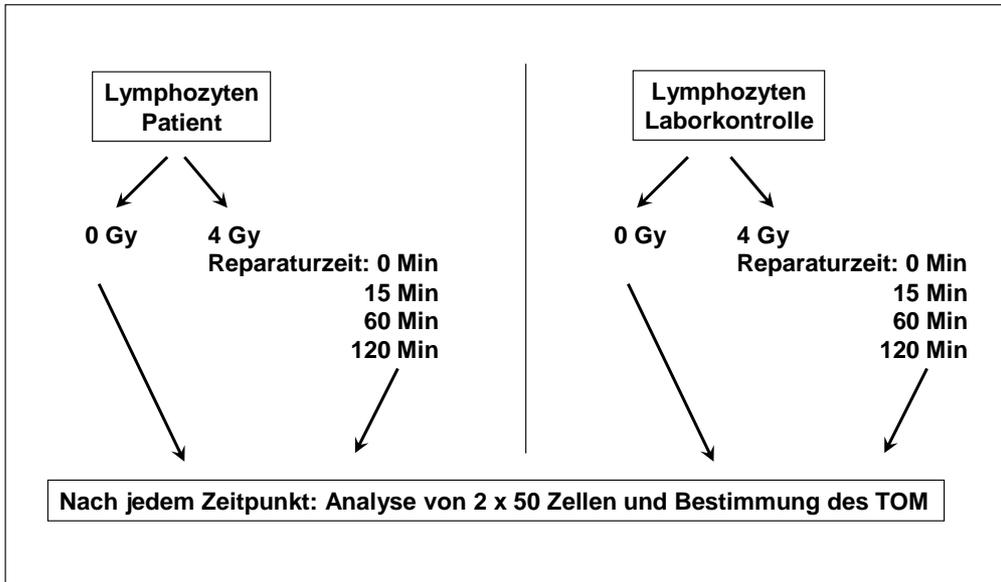
Ablaufschema des Comet-Assays



In der vorliegenden Studie wurden für jeden Ansatz 50.000 Lymphozyten eingesetzt. Die aliquotierten Lymphozyten wurden auf Eis bestrahlt (4 Gy) und auf Eis belassen bzw. für 15, 60 oder 120 Min bei 37 °C inkubiert, was die Reparatur der DNA-Schäden ermöglichte. Ein Parallelansatz der Zellen wurde nicht bestrahlt (0 Gy), ansonsten aber gleich behandelt. Weiterhin gab es für jedes Experiment eine interne Laborkontrolle; dies waren Lymphozyten der stets gleichen, gesunden Person, die genau wie die Lymphozyten der Patienten bzw. Kontrollpersonen behandelt wurden. Dadurch war es möglich, die Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Experimenten abzuschätzen und solche Experimente von der Auswertung auszuschließen, die anomale Ergebnisse bei der internen Laborkontrolle zeigten. Routinemäßig wurden in einem Comet-Experiment die Lymphozyten von drei verschiedenen Patienten (oder Kontrollpersonen) und der internen Laborkontrolle untersucht. Da die fünf Ansätze für jede Person in Doppelbestimmung

durchgeführt wurden, ergaben sich zehn Datensätze mit jeweils 50 Einzelzellen; für jedes Experiment also 40 Datensätze mit den gemessenen Parametern von insgesamt 2000 Zellen.

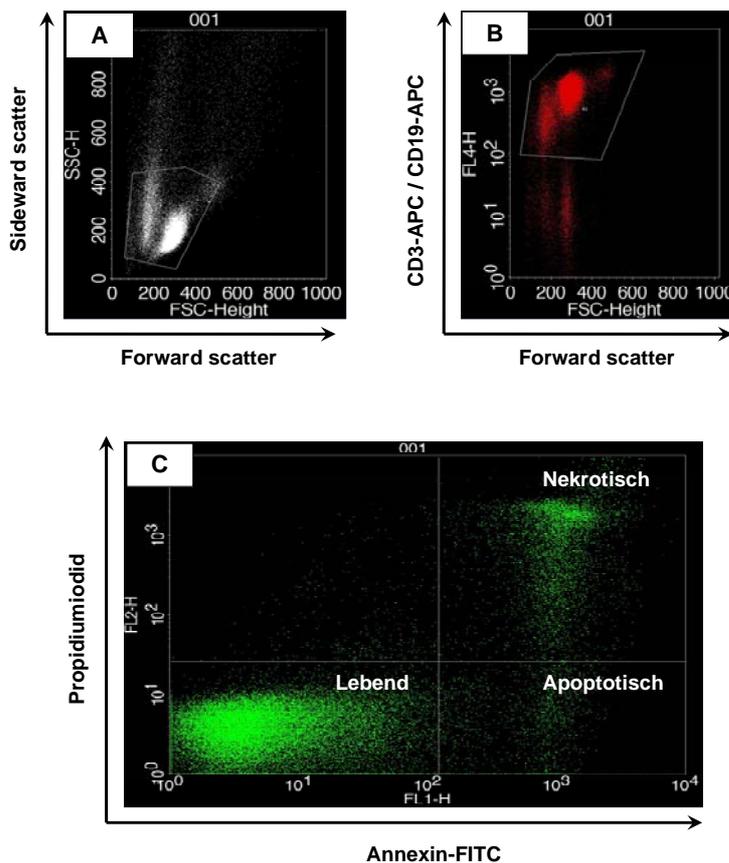
Ansätze des Comet-Assays:



8.2.3.1 Methode: Apoptose-Assay

Im Einzelnen wurden die isolierten Lymphozyten nach dem Auftauen für 12 Stunden kultiviert, gezählt und zu je 1×10^6 Zellen in drei Aliquots aufgeteilt. Zwei Aliquots wurden mit 0,4 Gy bzw. 0,8 Gy in einer γ -Strahlenquelle (Cs-137) bestrahlt, das dritte Aliquot diente als unbestrahlte Kontrolle. Alle Zellen wurden vor der FACS-Analyse für 48 Stunden in Kultur genommen. Nach der Ernte wurden die Zellen in einem ersten Schritt gleichzeitig mit zwei Antikörpern gegen CD3 (T-Zell-Marker) bzw. CD19 (B-Zell-Marker) inkubiert. Diese beiden Antikörper waren direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) gekoppelt. Im zweiten Schritt wurden die Zellen gleichzeitig mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumiodid und dem Phosphatidylserin-bindenden Protein AnnexinV inkubiert; letzteres war direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Apoptotische Zellen können aufgrund ihrer charakteristischen Externalisierung der Zellmembrankomponente Phosphatidylserin das AnnexinV binden, jedoch bleibt ihre Zellmembran für Propidiumiodid undurchlässig. Anders dagegen nekrotische Zellen, die sowohl AnnexinV binden als auch Propidiumiodid aufnehmen können. Somit können lebende, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden und quantifiziert werden.

Abbildung 8.2.3.1: Überblick FACS-Analyse.



8.2.3.4.2.K Tabelle: Apoptose-Rangliste (KORA)

Induzierte Apoptose (Rangliste) des Kontrollkollektivs (KORA). Für jede Bestrahlungsdosis (0,4 Gy bzw. 0,8 Gy) ist die induzierte Apoptose in % angegeben. Rot: Fälle mit guter Dosis-Korrelation. EBV: X bzw. 0: EBV-Immortalisierung erfolgreich (X) bzw. fehlgeschlagen (0).

Rang	0,4 Gy		0,8 Gy		Rangunterschied (bezogen auf 0,8 Gy)	EBV
	Induz. Apoptose	Fall	Fall	Induz. Apoptose		
1	-10,282094	Ep56	Ep25	0,35263339	1	
2	-3,83828263	Ep25	KORA-85	6,91139919	2	X
3	2,4269579	KORA-83	KORA-83	7,63367143	0	X
4	2,69223403	KORA-85	KORA-67	7,92416893	7	0
5	5,04381463	Ep21	Ep31	8,20122192	23	
6	5,29719162	KORA-91	KORA-95	8,61937912	11	0
7	5,48579193	Ep30	KORA-113	8,97412363	1	X
		KORA-				
8	5,71172178	113	KORA-107	9,2916493	5	X
9	5,73618175	KORA-89	KORA-91	9,36791639	3	0
10	5,86355286	Ep5	KORA-75	9,52101478	11	
11	6,77220957	KORA-67	KORA-105	10,1395326	13	
12	6,94291219	KORA-69	KORA-89	10,2364043	3	X
		KORA-				
13	7,07761417	107	KORA-69	10,4882293	1	X
14	7,10204311	Ep19	KORA-101	10,8904456	9	
15	7,26296967	KORA-93	Ep30	11,8356928	8	
16	7,42501874	KORA-97	Ep37	12,0027517	30	
17	7,43474946	KORA-95	KORA-93	12,0341817	2	
18	7,43977023	Ep16	Ep55	12,523675	8	
19	7,52162272	Ep44	Ep38	12,6738885	9	
20	7,61855874	KORA-25	KORA-103	13,0673298	13	
21	7,80191495	KORA-75	Ep34	13,2281734	39	
22	7,81391656	Ep27	KORA-97	13,2691466	6	
		KORA-				
23	7,89139971	101	KORA-25	13,422577	3	
		KORA-				
24	8,46007848	105	Ep8	13,4997023	19	
25	8,82697086	Ep6	EpK90	14,2200556	11	
26	9,3222204	Ep55	KORA-109	14,3852979	15	
27	9,61034744	Ep31	KORA-77	14,542708	5	
28	10,0408864	Ep38	Ep21	14,6915982	23	
29	10,0460624	EpK82	EpK70	15,5852019	38	
30	10,1820786	Ep18	KORA-99	16,3796792	4	
31	10,5582259	KORA-21	Ep6	16,6862151	6	
32	10,8938488	KORA-77	Ep15	17,5465326	6	
		KORA-				
33	10,9712823	103	KORA-87	18,2024952	12	
34	11,0643061	KORA-99	KORA-53	18,4371567	8	
35	11,0949112	Ep13	KORA-21	18,8227284	4	
36	11,2262077	EpK90	Ep54	19,1467628	27	
37	11,3335012	Ep41	Ep40	19,67361	66	

38	11,4429879	Ep15	EpK87	19,9744042	46	
39	11,8155447	Ep9	Ep20	20,1456764	12	
40	12,239786	Ep32	Ep13	20,1462293	5	
		KORA-				
41	12,3984407	109	KORA-65	21,0537157	17	
42	12,4536486	KORA-53	Ep18	21,0755922	12	
43	12,5466951	Ep8	EpK66	21,1613032	21	
44	12,6810652	Ep2	Ep14	21,1921584	24	
45	12,8973427	KORA-87	EpK69	21,2924446	12	X
46	13,3306571	Ep37	Ep29	21,8431418	6	0
47	13,4172204	Ep24	Ep10	22,0793512	9	0
48	13,78731	EpK74	Ep33	22,2078401	2	
49	13,8054621	KORA-81	EpK67	22,2635558	20	
50	13,9864941	Ep33	EpK89	22,4922593	22	
51	14,3106601	Ep20	KORA-73	22,6932312	15	
52	14,4415618	Ep29	Ep32	22,8607918	12	
53	14,5440428	Ep36	Ep9	23,0259245	14	
54	14,5707079	Ep46	Ep44	23,0784048	35	
55	14,5944902	KORA-79	KORA-71	23,1720715	7	
56	14,7664754	Ep10	KORA-23	23,1899848	3	X
57	14,8493778	EpK69	Ep24	23,5803066	10	
58	15,0131363	KORA-65	KORA-81	23,6498691	9	
59	15,118134	KORA-23	EpK88	23,7631377	24	
60	15,2521882	Ep34	KORA-111	24,7390476	1	
		KORA-				
61	15,4484355	111	EpK74	24,8773178	13	
62	15,8122632	KORA-71	KORA-79	25,0071643	7	X
63	15,8382614	Ep54	EpK72	27,0769248	16	
64	15,8792862	EpK66	EpK64	27,2511696	38	
65	16,0494538	Ep3	Ep2	27,63367	21	
66	16,1029931	KORA-73	EpK75	27,6346361	12	
67	16,1974209	EpK70	Ep11	27,7445407	19	
68	16,2542448	Ep14	EpK84	28,1530999	7	
69	16,3436352	EpK67	EpK86	28,2461176	2	
70	16,7202646	Ep1	Ep58	28,3966474	19	
71	16,903129	EpK86	Ep3	28,5239429	6	
72	17,080262	EpK89	Ep41	28,6814965	35	
73	17,3990614	EpK71	EpK68	28,9961777	31	
74	17,739131	EpK78	EpK85	29,3911124	13	
75	18,5707024	EpK84	Ep16	29,4500123	57	
76	18,5851502	Ep23	KORA-55	29,704892	22	
77	18,7792206	Ep35	Ep57	29,8393355	28	
78	18,7924078	EpK75	Ep23	30,8888401	2	
79	19,1708475	EpK72	EpK77	31,3121326	2	
		KORA-				
80	19,3513852	115	EpK71	31,3902486	7	
81	19,4883557	EpK77	EpK79	31,9353587	14	
82	19,5512836	Ep17	Ep42	31,9377238	6	
83	19,6201244	EpK88	EpK61	32,3047501	17	
84	19,6367893	EpK87	EpK62	32,4883905	13	
85	19,8735517	Ep45	EpK76	32,9864071	6	
86	20,1330648	Ep11	Ep1	33,2270402	16	
87	20,5905896	EpK85	KORA-27	33,3940676	5	
88	20,7564396	Ep42	EpK78	33,4576471	14	
89	20,929067	Ep58	Ep5	34,5961068	79	

90	21,2515443	Ep39	Ep36	34,649046	37	
91	22,4428318	EpK76	Ep7	35,0631303	5	
92	22,9830696	KORA-27	EpK82	35,2282637	63	
93	23,2721927	Ep12	Ep45	35,3959931	8	
94	23,4340018	EpK81	Ep17	36,6876582	12	
95	23,4468124	EpK79	Ep56	36,8609296	94	
96	23,953297	Ep7	Ep43	37,7227849	12	
97	23,9745219	EpK62	EpK63	38,149375	9	0
98	24,0376002	KORA-55	Ep27	38,7651532	76	
99	24,2741786	EpK73	KORA-115	39,1081584	19	
100	24,9599439	EpK61	Ep39	39,40692	10	
101	25,2992059	EpK80	Ep46	40,178943	47	
102	25,6828537	EpK64	Ep35	40,362332	25	
103	26,1122935	Ep40	EpK80	40,4411607	2	X
104	26,9576698	EpK68	Ep59	41,9632685	5	X
105	28,0048559	Ep57	Ep12	41,9680142	12	
106	29,6862652	EpK63	EpK73	43,8397244	7	X
107	33,1625544	EpK83	Ep53	44,3285925	4	X
108	33,1769014	Ep43	Ep60	44,8527485	4	X
109	36,0063109	Ep59	EpK83	47,3023001	2	
110	40,6484351	Ep4	EpK81	48,7476453	16	
111	41,5101043	Ep53	Ep4	49,834635	1	X
112	47,9221334	Ep60	Ep19	49,8612124	98	
113	61,3461777	EpK65	EpK65	51,6918677	0	

8.2.3.4.2.L Tabelle: Apoptose-Rangliste (LUCY)

Induzierte Apoptose (Rangliste) der jungen Lungentumor-Patienten (LUCY). Für jede Bestrahlungsdosis (0,4 Gy bzw. 0,8 Gy) ist die induzierte Apoptose in % angegeben. Rot: Fälle mit guter Dosis-Korrelation. EBV: X bzw. 0: EBV-Immortalisierung erfolgreich (X) bzw. fehlgeschlagen (0).

Rang	0,4 Gy		0,8 Gy		Rangunterschied (bezogen auf 0,8 Gy)	EBV
	Induz. Apoptose	Patient	Patient	Induz. Apoptose		
1	-7,64455866	Ep462	Ep712	-5,43300681	32	
2	-1,80390094	Ep1053	Ep1053	1,63935648	0	0
3	-0,6320582	Ep792	Ep766	6,17576324	8	0
4	2,08122716	Ep494	Ep494	8,40143592	0	X
5	2,65712433	Ep407	Ep792	8,79681615	2	
6	3,12477013	Ep393	Ep154	10,0338991	26	
7	4,68559677	Ep654	Ep811	11,0126115	3	
8	5,04230533	Ep836	12006	11,4605871	9	
9	5,51859991	Ep500	Ep421	11,6848678	13	
10	6,06847444	Ep811	Ep602	11,9160673	2	X
11	6,80708293	Ep766	Ep716	11,9514623	5	
12	7,09206354	Ep602	Ep531	12,359067	13	
13	7,23129801	Ep872	Ep482	13,18639	5	X
14	8,03561205	Ep414	Ep62	13,5002789	24	
15	9,00014275	Ep700	Ep817	13,5996187	15	
16	9,05656781	Ep716	Ep393	13,6488835	10	
17	9,29643091	12006	Ep511	13,8014855	28	

18	10,1177412	Ep482	Ep76	14,6727562	21	
19	10,1796502	Ep973	Ep807	14,6759216	37	
20	10,3259715	Ep684	Ep462	15,0183129	19	
21	10,7390111	Ep911	Ep536	15,0426229	14	
22	11,2978286	Ep421	Ep787	15,4880849	2	
23	12,3180001	Ep419	Ep621	16,2475898	31	
24	12,45726	Ep787	Ep500	16,6570971	15	
25	12,763397	Ep531	Ep407	16,7292207	20	
26	12,9540609	Ep901	17001	17,1484544	3	
27	13,0320199	Ep666	Ep510	17,268173	19	
28	13,4185435	Ep539	Ep812	17,8654062	45	
29	13,4994417	17001	Ep411	18,0201065	15	
30	13,751953	Ep817	Ep414	18,1547006	16	
31	14,3924069	Ep459	Ep108	19,1235769	24	0
32	14,5586994	Ep154	Ep973	19,3417845	13	
33	14,8547605	Ep712	Ep1060	19,7773368	20	
34	14,9876377	Ep683	Ep551	20,3692086	27	
35	15,2895922	Ep536	Ep126	20,4941198	16	
36	15,4509298	Ep472	Ep700	20,7348096	21	
37	15,4944001	Ep617	Ep799	20,8132253	25	
38	15,743609	Ep62	Ep666	21,7557061	11	
39	16,1557297	Ep76	Ep627	22,1642136	4	
40	16,2864705	Ep856	Ep901	22,2953283	14	
41	16,4187612	Ep415	Ep493	22,8520831	1	
42	16,5384965	Ep493	Ep856	23,5562401	2	
43	16,5777861	Ep627	Ep717	23,5864201	31	
44	16,6570391	Ep411	Ep476	24,0207626	13	0
45	16,851825	Ep511	Ep911	24,2477186	24	
46	16,9747952	Ep510	Ep419	24,2688366	23	
47	17,1027038	Ep436	Ep683	24,3248295	13	
48	17,1743577	Ep873	Ep397	24,9593228	46	
49	17,5546908	Ep598	Ep485	25,2682668	3	X
50	17,7095242	Ep1040	Ep459	25,9816701	19	
51	17,8108986	Ep126	Ep872	26,0372233	38	
52	17,887935	Ep485	Ep715	26,1171138	24	
53	18,0781175	Ep1060	Ep448	26,3936544	19	
54	18,141971	Ep621	Ep436	26,6157027	7	0
55	18,2479693	Ep108	Ep874	27,0003364	23	
56	18,5422368	Ep807	Ep537	28,1136862	27	
57	19,3485458	Ep476	Ep684	28,279827	37	
58	19,4913394	Ep460	Ep416	28,423537	5	
59	20,0629918	Ep924	Ep1040	28,4648814	9	0
60	20,1625825	Ep1057	Ep617	28,7376807	23	
61	20,6272036	Ep551	Ep501	28,7946903	10	
62	20,9382619	Ep799	Ep472	29,0982117	26	
63	21,0403334	Ep416	Ep393	29,1204568	1	
64	21,0548392	Ep393	Ep677	29,1322899	5	
65	21,1640409	Ep636	Ep654	29,2273995	58	
66	21,9391084	Ep405	Ep924	29,5936178	7	
67	22,595128	Ep64	Ep1057	29,7779136	7	
68	22,7523102	Ep782	Ep836	29,8647248	60	
69	22,9948239	Ep677	Ep613	30,5895316	8	
70	23,2508217	Ep993	Ep702	31,136991	11	
71	23,4258208	Ep501	Ep993	31,3803967	1	
72	23,8705619	Ep448	Ep598	31,5660521	23	

73	23,9768588	Ep812	Ep410	31,5663936	2	
74	24,0554816	Ep717	Ep422	31,7346297	12	
75	24,2726514	Ep410	Ep636	31,77758	10	
76	24,4310583	Ep715	Ep539	31,947405	48	
77	25,7610314	Ep613	Ep615	32,5887776	8	
78	26,3395055	Ep874	Ep64	32,7922302	11	
79	26,6385832	Ep734	Ep782	32,9443632	11	
80	27,4432704	Ep449	Ep734	34,1268565	1	
81	27,4793519	Ep702	Ep873	34,8697219	33	
82	27,6952203	Ep825	Ep445	35,6091285	13	
83	28,2171333	Ep537	Ep862	35,6131605	6	X
84	28,4731334	Ep600	Ep600	35,6776731	0	0
85	28,6613884	Ep615	Ep405	36,832991	19	
86	28,833508	Ep422	Ep460	37,1108812	28	
87	30,3162577	Ep420	Ep420	37,374463	0	
88	30,4763959	Ep772	Ep449	39,8685406	8	X
89	31,3863994	Ep862	Ep415	42,7997051	48	
90	32,1558257	Ep805	Ep772	43,8012188	2	0
91	32,2953594	Ep935	Ep825	43,8801361	9	0
92	35,8263697	Ep818	Ep935	44,9332853	1	X
93	38,1339472	Ep690	Ep805	45,2721287	3	
94	39,7933157	Ep397	Ep690	47,1117234	1	
95	43,6762017	Ep445	Ep824	50,0182975	1	
96	45,4331729	Ep824	Ep818	51,1821095	4	X

8.2.3.4.2. Leu: Tabelle Apoptose-Rangliste (Leukämien)

Induzierte Apoptose (Rangliste) der Leukämie-Patienten. Für jede Bestrahlungsdosis (0,4 Gy bzw. 0,8 Gy) ist die induzierte Apoptose in % angegeben. Rot: Fälle mit guter Dosis-Korrelation.

Rang	0,4 Gy		0,8 Gy		Rangunterschied (bezogen auf 0,8 Gy)
	Induz. Apoptose	Patient	Patient	Induz. Apoptose	
1	-68,4615385	Re108	Re108	-51,3567748	0
2	-32,4452795	Re003	Re140	-38,5245178	63
3	-25,9802819	Re126	Re003	-18,5448575	1
4	-21,2197608	Mü73	Mü73	-16,7506623	0
5	-17,1060815	R-7	R-7	-5,56685528	0
6	-9,83347573	Mü53	Re023	-4,56265641	1
7	-6,39292482	Re023	Mü53	-4,07064591	1
8	-5,37953822	Re134	Mü51	-4,05620299	6
9	-0,80650187	Mü48	Re112	-3,93677867	34
10	-0,316478	R-2	Re126	-0,27283982	7
11	0,40373133	R-3	R-2	-0,12860566	1
12	0,44182229	Re080	Mü11	0,26555276	9
13	0,59838759	Mü43	Mü71	1,87174421	11
14	0,62994268	Mü51	Mü29	2,36883219	1
15	0,96109382	Mü29	R-8	4,51092407	8
16	1,42909039	Re124	Mü67	5,80580767	34
17	2,12903226	Re138	Mü43	6,68036688	4

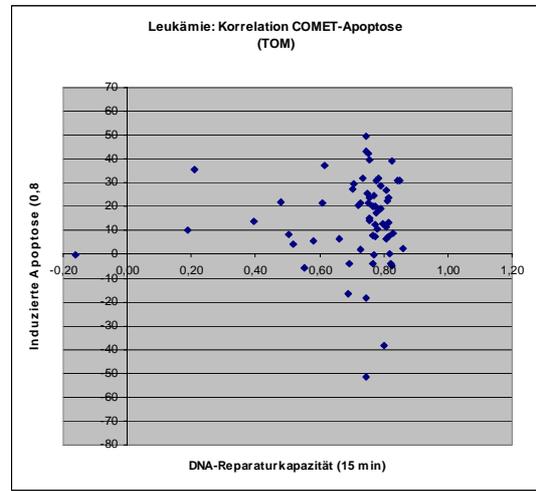
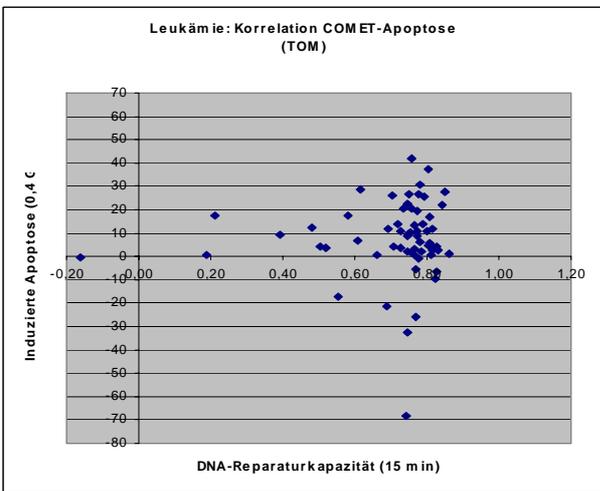
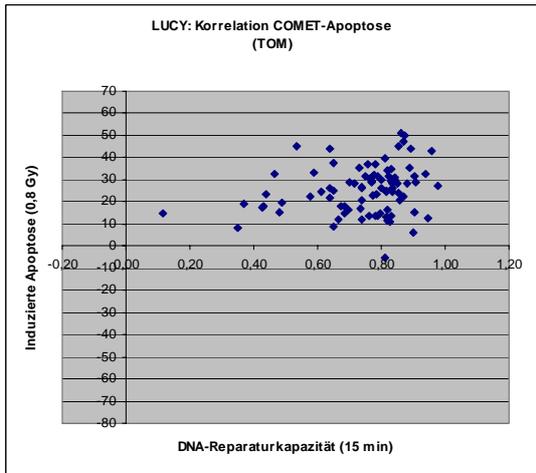
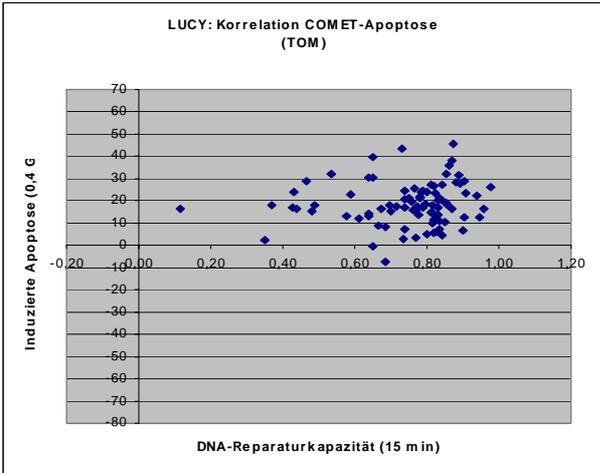
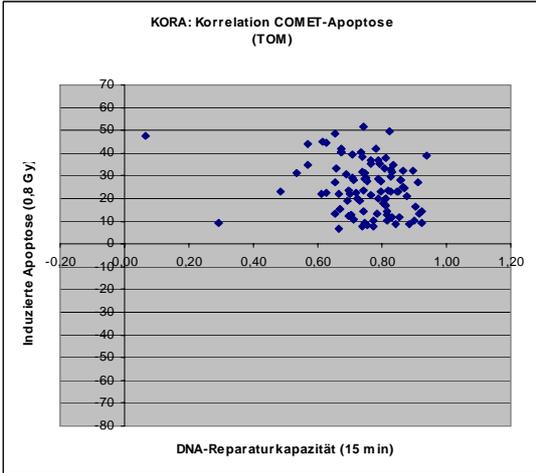
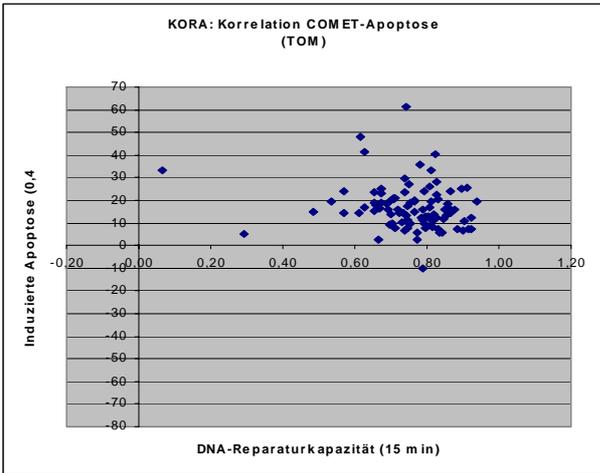
18	2,13037611	Mü31	Re047	6,69352461	12
19	2,65343376	Re052	Mü20	7,42017398	15
20	2,78166218	Re039	Mü116	7,58001315	6
21	3,27566306	Mü11	Re098	7,93962636	1
22	3,32328592	Re098	R-1	8,55224503	5
23	3,61237579	R-8	Re039	8,66136703	3
24	3,73449769	Mü71	R-3	10,2202058	13
25	3,95306719	Re106	Re009	10,5026968	7
26	3,98512199	Mü116	Re005	11,360786	5
27	4,04495557	R-1	Re100	11,9007215	2
28	4,11988174	Re136	Re114	12,3665893	11
29	4,47259936	Re100	Re034	12,9107705	11
30	4,54481034	Re047	Re052	13,2472792	11
31	5,89672082	Re005	Re019	13,5817398	5
32	6,36625908	Re009	Re007	14,2639538	6
33	6,63725776	Re063	Re124	15,3231733	17
34	8,61202258	Mü20	Mü48	17,3108584	25
35	8,71912239	Re086	R-9	18,0970489	6
36	9,04331781	Re019	Mü31	18,8198024	18
37	9,67778195	Re057	Mü101	19,4130001	20
38	10,3841624	Re007	Mü25	20,0427892	8
39	10,5739369	Re114	Re001	20,2321795	13
40	10,6601011	Re034	Re090	20,5021014	8
41	10,7587771	R-9	Re057	21,3413887	4
42	10,8304	Re069	Re069	21,3789784	0
43	11,6060552	Re112	Re063	21,5584935	10
44	11,7497786	Re132	R-4	22,0364438	1
45	12,4730283	R-4	Mü45	22,2304787	17
46	13,4692476	Mü25	Re080	22,4167404	34
47	13,6516391	Mü33	Re132	23,6318688	3
48	13,706558	Re090	Mü84	23,8341859	5
49	16,9792939	Re092	Re134	24,5316462	41
50	17,3513075	Mü67	Re086	25,7913065	15
51	17,6908801	Mü96	Re092	27,0612105	2
52	19,2444016	Re001	Re122	27,4530594	6
53	20,6427734	Mü84	Mü33	28,6096308	6
54	20,7590801	Re079	Re106	29,5971504	29
55	22,0376281	Re015	Re015	30,8359953	0
56	22,7414177	Re142	Re128	30,889797	15
57	25,4004447	Mü101	Mü82	31,1118076	3
58	26,0364534	Re122	Mü41	32,0008535	6
59	26,4445585	Re027	Re079	32,0212739	5
60	26,6407926	Mü82	Mü96	35,6868263	9
61	27,5054614	Re128	Mü61	37,1774695	2
62	28,0107773	Mü45	Re136	38,9608002	34
63	28,9236553	Mü61	Re088	39,4964707	3
64	30,9507528	Mü41	Re027	42,1992452	5
65	37,4858395	Re140	Re142	43,264623	9
66	42,0822963	Re088	Re138	49,6129032	49

8.2.4.2: Korrelation: Apoptose und DNA-Reparatur

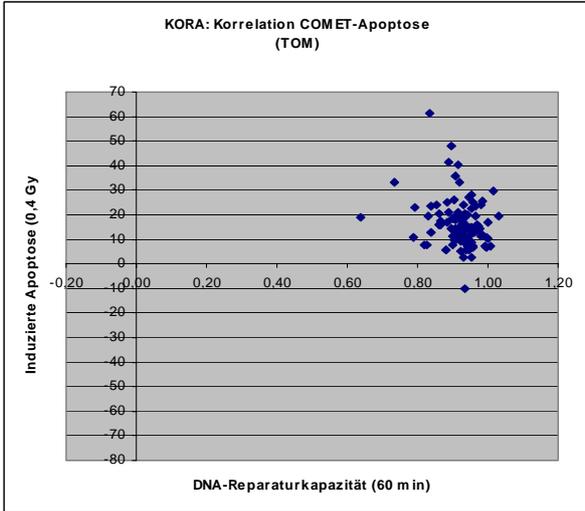
0,4 Gy

0,8 Gy

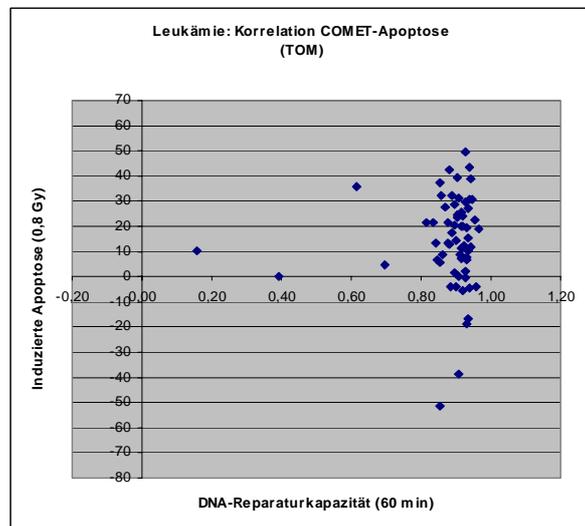
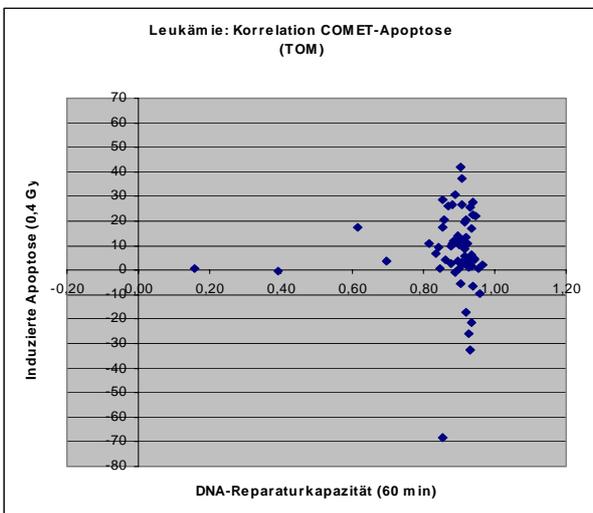
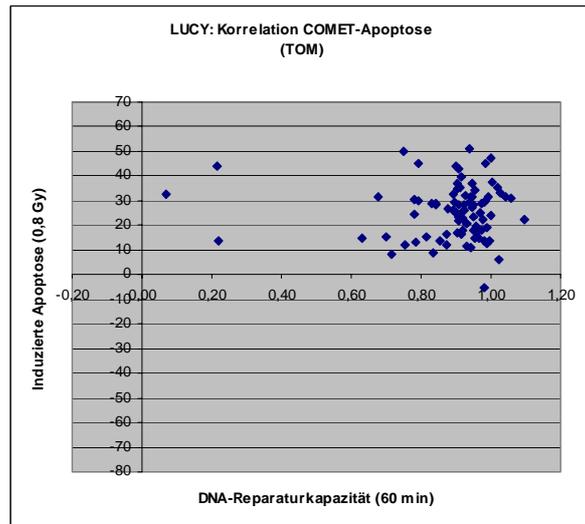
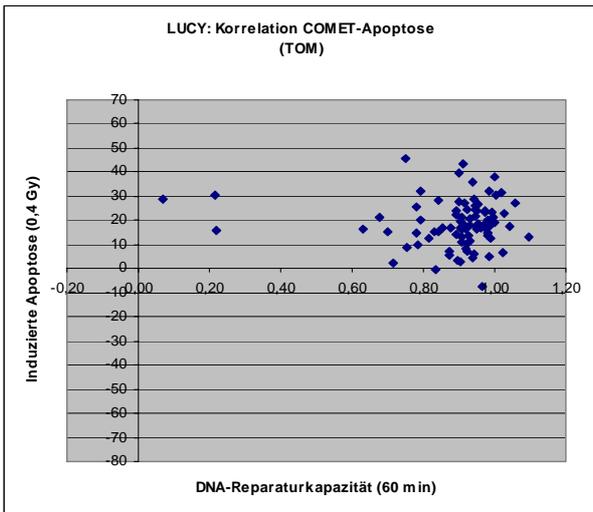
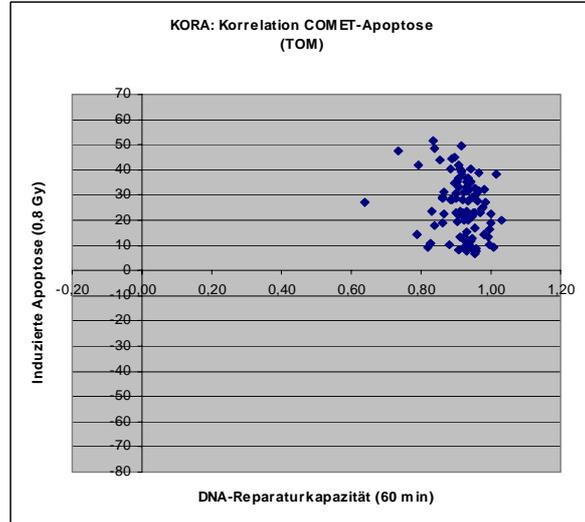
TOM, 15 min



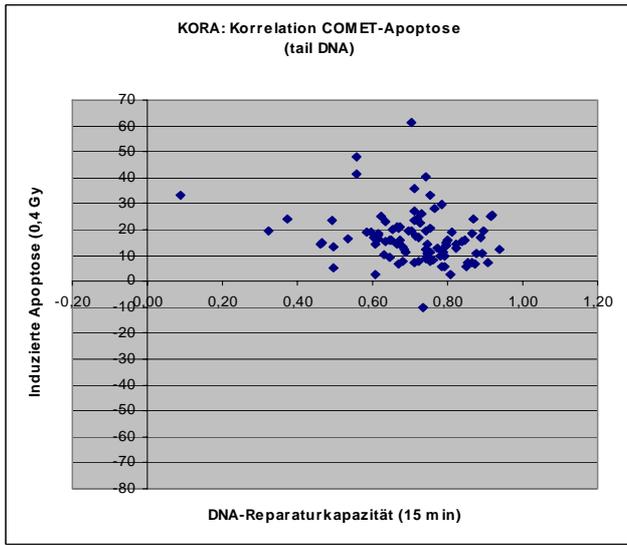
0,4 Gy
TOM, 60 min



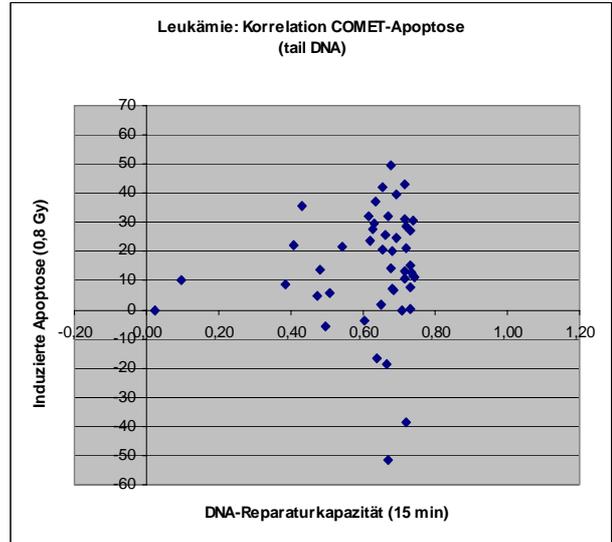
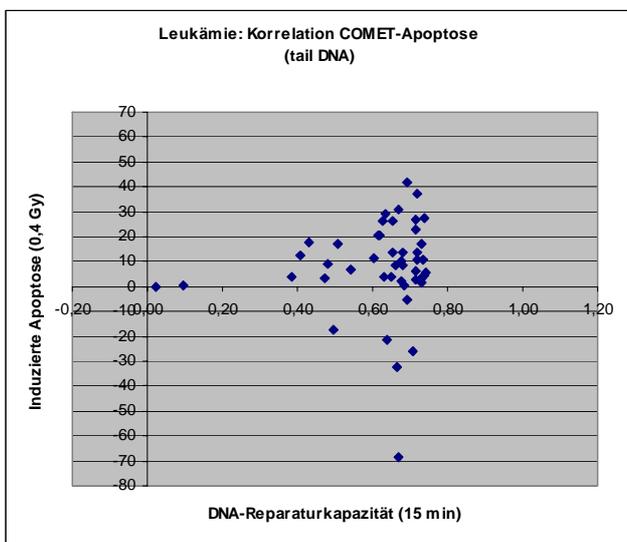
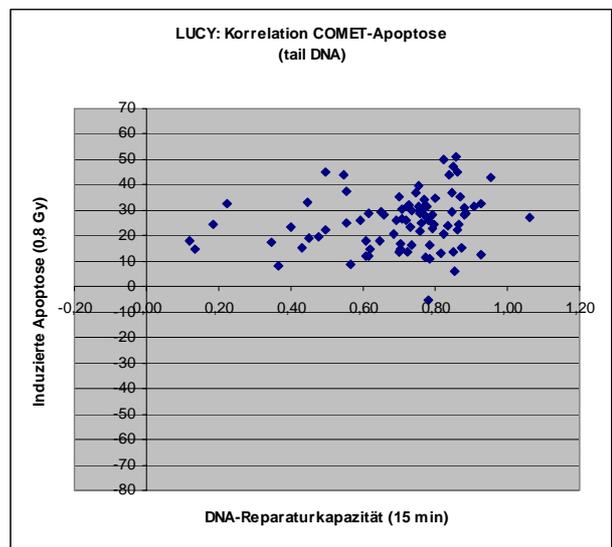
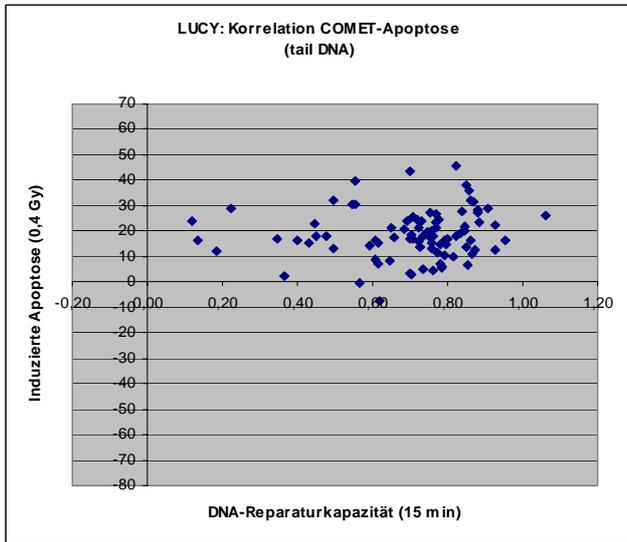
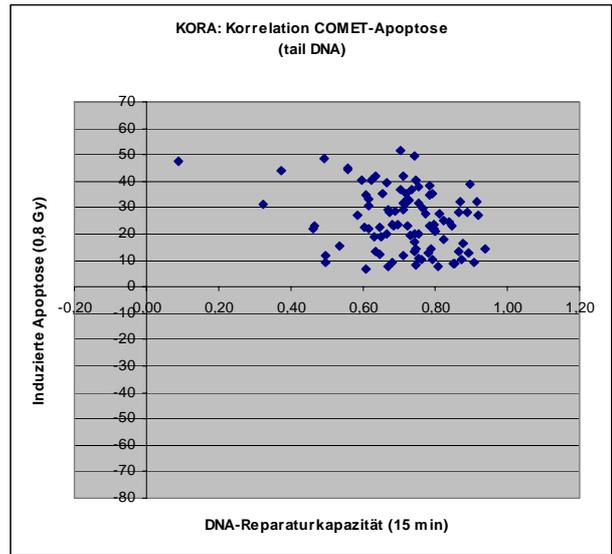
0,8 Gy



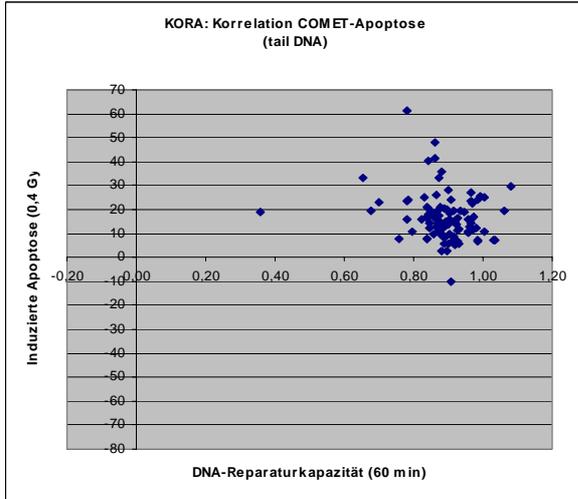
0,4 Gy
tail-DNA, 15 min



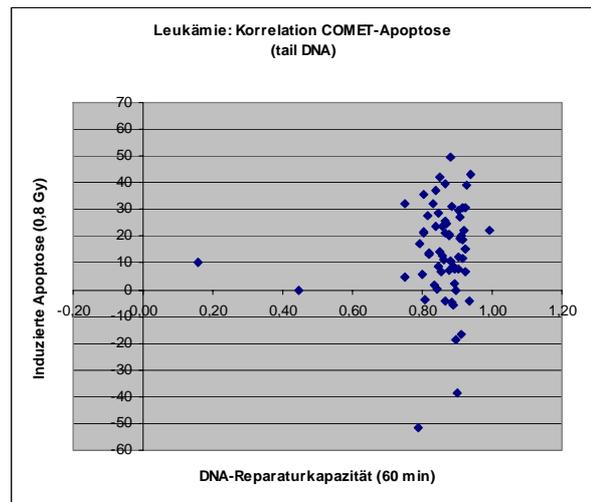
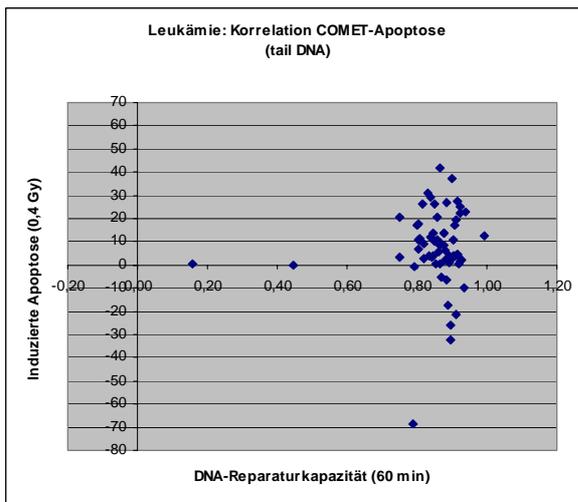
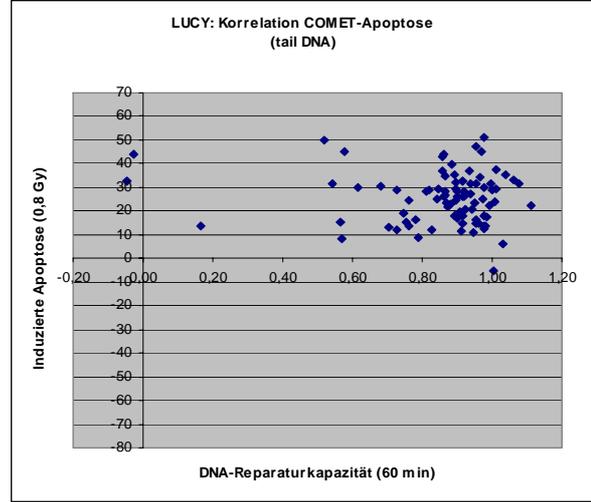
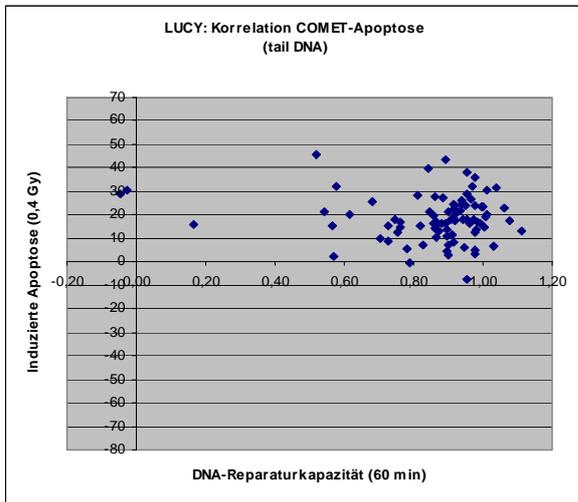
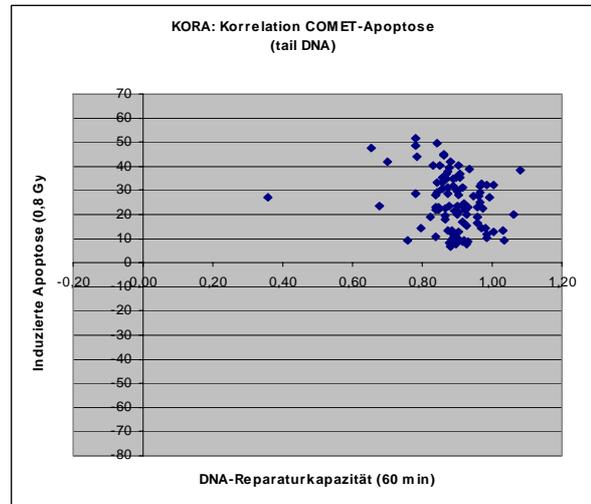
0,8 Gy



0,4 Gy
tail-DNA, 60 min



0,8 Gy



8.3.2.1 Überblick der EBV-immortalisierten Zelllinien gesunder Kontrollpersonen (KORA) und durchgeführter Experimente

Apoptose-rate	ausgewählter Fall (interne Bezeichnung)	EBV-Immortalisierung	Protein-Isolierung (Jena)	cDNA-Isolierung (Jena)	SubG1-Assay (München)	Caspase-Assay (München)
Hoch	(Epk 63)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep 59)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Epk 73)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep53)	nicht in Jena verfügbar	--	--	ja	ja
	(Ep 60) (wächst langsam)	ja	sehr	ja	ja	ja
	(Ep4)	nicht in Jena verfügbar	--	--	ja	ja
	(Epk 80)	ja	ja	ja	ja	ja
Mittel	(Ep29)	erfolglos	--	--	--	--
	(KORA 79)	ja	ja	ja	--	--
	(Ep10)	erfolglos	--	--	--	--
	(EpK 69)	ja	ja	ja	--	--
	(KORA 23)	ja	ja	ja	--	--
Niedrig	(KORA 85)	ja	ja	ja	ja	ja
	(KORA 83)	ja	ja	ja	ja	ja
	(KORA 67)	erfolglos	--	--	--	--
	(KORA 95)	erfolglos	--	--	--	--
	(KORA 113)	ja	ja	ja	ja	ja
	(KORA 107)	ja	ja	ja	--	--
	(KORA 91)	erfolglos	--	--	--	--
	(KORA 89)	ja	ja	ja	Ja	ja
	(KORA 69)	ja	ja	ja	ja	ja

8.3.2.1/1 Überblick der EBV-immortalisierten Zelllinien junger Lungentumorzellen und durchgeführter Experimente

Apoptose -rate	ausgewählter Fall (interne Bezeichnung)	EBV- Immortalisi- erung	Protein- Isolierung (Jena)	cDNA- Isolierung (Jena)	SubG1- Assay (München)	Caspase- Assay (München)
Hoch	(Ep862)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep600)	erfolglos	--	--	--	--
	Ep449)	ja	ja	ja	ja	Ja
	(Ep772)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep825)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep935)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep818)	ja	ja	ja	ja	ja
Mittel	(Ep436)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep1040)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep485)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep108)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep476)	erfolglos	--	--	--	--
Niedrig	(Ep1053)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep766)	erfolglos	--	--	--	--
	(Ep494)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep602)	ja	ja	ja	ja	ja
	(Ep482)	ja	ja	ja	ja	ja

8.3.2.2. Methode: Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion

Lösung I (Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion)

584 mg/ml NaCl

1 g/l NaCitrat

0,3 ml/l NP-40

10 mg/l RNase A (frisch zugeben)

10 µg/ml PI (frisch zugeben)

Lösung II (Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion)

15 g/l Zitronensäure

0,25 M Saccharose

10 µg/ml PI (frisch zugeben)

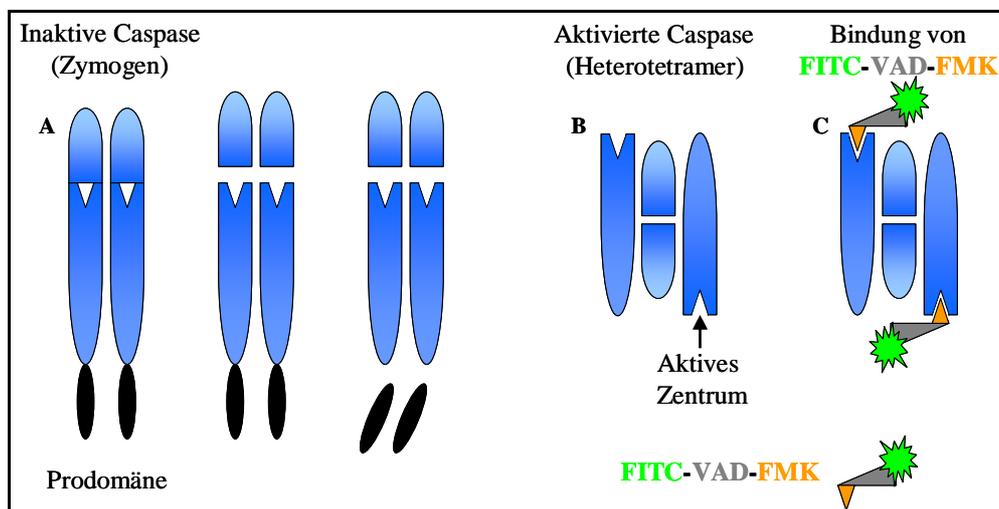
Die in Kultur gehaltenen Zellen werden vor Bestrahlung zunächst in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml Medium ausgesät, dann jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy bzw. mit 0 Gy als Kontrolle geerntet und mit PBS gewaschen. Eventuell ist (je nach Zellwachstum) für die späteren Zeitwerte die Zugabe von Medium nach 24 h bzw. 48 h sinnvoll, dies wird bei Bedarf durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgt eine Inkubation mit Lösung I für 30 bis 60 min gefolgt von Zugabe von gleichem Volumen Lösung II. Die Proben können bis zur Messung maximal zwei Wochen bei 4 °C im Dunklen aufbewahrt werden. Die rote Fluoreszenz wird mit einem Langpassfilter für Wellenlängen >600 nm detektiert und auf einer linearen Skala quantifiziert. Durch Analyse der Spannungsabfallkurve am Fluoreszenzdetektor werden Zelldoubletten, die die Auswertung stören, nicht miterfasst. Alle Zellen, die eine geringere Fluoreszenz als Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus hatten, werden als apoptotisch klassifiziert. Die Anregungswellenlänge ist 488 nm. Um eine bessere Auftrennung der Populationen zu gewährleisten, sollte die Messung nach Möglichkeit im langsamen Aufnahmemodus durchgeführt werden.

8.3.2.3. Detektion von Caspasen durch einen fluorochrommarkierten Caspase-Inhibitor

Caspase Inhibitor-Lösung

0,2% CaspACE™ FITC-VAD-FMK *In Situ* Marker
in PBS

Die vor Bestrahlung zunächst in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml Medium ausgesäten Zellen werden jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung mit 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy bzw. mit 0 Gy (Kontrolle) geerntet, auch hier ist eventuell (je nach Zellwachstum) für die späteren Zeitwerte die Zugabe von Medium nach 24 h bzw. 48 h sinnvoll, das Sediment wird sofort in 70 μ l der Caspase Inhibitor-Lösung aufgenommen und für 20 min im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS erfolgt Zentrifugation für 5 min bei 300 x g, RT. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 400 μ l PBS aufgenommen. Die so behandelten Proben sollten zeitnah gemessen werden und bis zur Messung bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt werden. Die Analyse wird im Durchflusszytometer bei der Wellenlänge 530 nm durchgeführt.



Schematische Darstellung der Funktionsweise des Caspase-Inhibitors FITC-VAD-FMK. (nach Smolewski, 2002).

A: Die inaktive Caspase wird aktiviert.

B: Die aktivierte Caspase bildet ein Tetramer.

C: Ein mit FITC markierter Caspaseinhibitor bindet an das enzymatische Zentrum der Caspase.

8.3.3: Tabelle: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des KORA-Kollektivs.

In der Spalte „Versuch“ ist der Versuch bezeichnet, der an den LCL durchgeführt wurde, „Dosis 1“ ist die in diesem Versuch eingesetzte Dosis für die Bestrahlung. Verglichen wurden jeweils die in der Quantifizierung der hypodiploiden Zellfraktion (Sub G1) bzw. der Detektion von Caspasen durch Nachweis eines Caspase-Inhibitors (Caspase-Inhibitor) nach Bestrahlung in den LCL ermittelten Werte mit dem Anteil strahleninduzierter Apoptose im Annexin V Assay an primären Lymphozyten. Die im Annexin V Assay eingesetzte Strahlendosis ist unter „Dosis 2“ angeführt, „Zeitpunkt“ bezeichnet den Zeitpunkt der Ernte für die jeweiligen Versuche an den LCL. Die Ernte erfolgte im Annexin V Assay immer 48 h nach Bestrahlung. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beschreibt, ob eine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen in den LCL und den primären Zellen besteht. Die Art der Korrelation sagt aus, ob die mögliche Korrelation zwischen den Versuchen positiv oder negativ ist. Eine positive Korrelation (+) bedeutet, dass die Versuche in den LCL die Ergebnisse, die für die primären Lymphozyten gewonnen wurden, widerspiegeln, eine negative Korrelation (-) bedeutet, dass die LCL umgekehrtes Verhalten zeigen.

Versuch	Dosis 1	Dosis 2	Zeitpunkt	Bestimmtheitsmaß R^2	Art der Korrelation
Sub G1	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,39	-
			48 h	0,32	-
			72 h	0,12	-
		0,8 Gy	24 h	0,38	-
			48 h	0,19	-
			72 h	0,14	-
	12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,14	-
			48 h	0,27	-
			72 h	0,22	-
		0,8 Gy	24 h	0,25	-
			48 h	0,16	-
			72 h	0,21	-
Caspase-Inhibitor	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,03	+
			48 h	0,10	-
			72 h	0,32	+
		0,8 Gy	24 h	0,00	-
			48 h	0,15	-
			72 h	0,16	+
	12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,04	+
			48 h	0,07	-
			72 h	0,54	+
		0,8 Gy	24 h	0,01	+
			48 h	0,16	-
			72 h	0,36	+

8.3.3/1 Tabelle: Vergleich der strahleninduzierten Apoptoseraten in primären Lymphozyten mit ihren korrespondierenden lymphoblastoiden Zelllinien in Proben des LUCY-Kollektivs.

Versuch	Dosis 1	Dosis 2	Zeitpunkt	Bestimmtheitsmaß R ²	Art der Korrelation
Sub G1	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,13	+
			48 h	0,03	+
			72 h	0,00	+
	0,8 Gy	24 h	48 h	0,22	+
			48 h	0,09	+
			72 h	0,04	+
	8 Gy	0,4 Gy	24 h	0,16	+
			48 h	0,00	-
			72 h	0,01	+
	0,8 Gy	24 h	48 h	0,24	+
			48 h	0,01	+
			72 h	0,09	+
12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,01	+	
		48 h	0,01	+	
		72 h	0,00	-	
0,8 Gy	24 h	48 h	0,05	+	
		48 h	0,03	+	
		72 h	0,01	+	
Caspase-Inhibitor	4 Gy	0,4 Gy	24 h	0,24	+
			48 h	0,06	+
			72 h	0,11	+
	0,8 Gy	24 h	48 h	0,27	+
			48 h	0,05	+
			72 h	0,03	+
	8 Gy	0,4 Gy	24 h	0,33	+
			48 h	0,11	+
			72 h	0,06	+
	0,8 Gy	24 h	48 h	0,07	+
			48 h	0,06	+
			72 h	0,24	+
12 Gy	0,4 Gy	24 h	0,07	-	
		48 h	0,01	+	
		72 h	0,01	+	
0,8 Gy	24 h	48 h	0,04	-	
		48 h	0,00	+	
		72 h	0,00	-	

Das Bestimmtheitsmaß R² ermöglicht eine Aussage darüber, ob ein exakter linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen besteht. Ein Bestimmtheitsmaß R² < 0,5 bedeutet, dass keine Korrelation vorliegt, ein Bestimmtheitsmaß 0,5 < R² < 0,7 bedeutet eine leichte Korrelation der Datensätze. Die Werte des Bestimmtheitsmaßes waren nur im Vergleich des Annexin V Assays nach Bestrahlung mit 0,4 Gy mit der Detektion von Caspasen 72 h nach Bestrahlung größer als 0,5, nämlich R² = 0,54. In diesem speziellen Fall handelt es sich um eine leichte Korrelation, für alle anderen Paarungen von Datensätzen kann kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. In sämtlichen Vergleichen zwischen Datensätzen des LUCY Kollektivs konnte lediglich ein Bestimmtheitsmaß von R² < 0,5 festgestellt werden, ein linearer Zusammenhang konnte also ausgeschlossen werden.

8.4.1 Protokoll: Quantifizierung des NAD⁺ Gehalts

Kaliumphosphatpuffer (Quantifizierung von NAD[±])

100 mM Kaliumphosphat pH 7.4
3% Trichloressigsäure

Neutralisationspuffer (Quantifizierung von NAD[±])

800 mM KOH
200 mM Tris

Reaktionsmix (Quantifizierung von NAD[±])

100 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer
0,02 g MTT-Pulver (ca. 500 µM)
0,0082 g PMS
3,06 ml Ethanol (560 mM)
bei 4 °C lagern, vor Licht schützen!

Der kolorimetrische Nachweis zur Quantifizierung des NAD⁺-Gehalts basiert auf einer Reihe von Oxidations- und Reduktionsvorgängen, die zyklisch miteinander verbunden sind (*enzyme cycling assay*). Er ermöglicht indirekt eine Untersuchung der Aktivität von Parp1 (Poly(ADP)ribose-Polymerase 1) und damit auch der Aktivität von Xrcc1 (*X-ray repair cross complementing 1*) im Zuge der Reparatur von Basenschäden. Werden Zellen z. B. mit einem Agens wie Methylmethansulfonat (MMS), mit H₂O₂ oder durch Bestrahlung behandelt, können Einzelstrangbrüche (*single strand breaks, SSB*) der DNA auftreten. Eines der ersten Proteine, die zur Schadensstelle rekrutiert werden, ist Parp1. Da Parp1 die Poly(ADP)ribosylierung katalysiert und die Poly(ADP)ribose (PAR) Synthese unter Verbrauch von NAD⁺ stattfindet, führen vermehrte Basenschäden so zu einer Verarmung an NAD⁺ in einer Zelle. Nach erfolgter Poly(ADP)ribosylierung werden weitere Reparaturproteine, darunter auch Xrcc1, an die Schadensstelle rekrutiert. Die Bestimmung des NAD⁺-Gehalts erfolgt über den bereits erwähnten *enzyme cycling assay* (Abb. siehe unten).

Die Alkoholdehydrogenase (*ADH*) setzt hierbei unter Verbrauch von NAD⁺ Ethanol zu Ethanal um. Mit Hilfe der Reduktion von N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS) in ursprünglich oxidiertem Zustand kann das entstandene NADH wieder zu NAD⁺ regeneriert werden. Durch die Reduktion von 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium-bromid (MTT) kann das reduzierte PMS wieder in den oxidierten Zustand versetzt werden und steht für weitere Reaktionszyklen zur Verfügung. In diesem letzten Reduktionsschritt wird oxidiertes, gelb gefärbtes MTT in reduziertes, violett gefärbtes MTT umgewandelt. Diesen Farbwechsel kann man idealerweise bei der Wellenlänge 595 nm messen. Da das vorhandene Photometer jedoch nur 570 nm, nicht aber 595 nm erfassen kann und eine Messung bei 570 nm möglich ist, wird die Menge an violetterem MTT bei 570 nm im Photometer gemessen. Daraus können Rückschlüsse auf die Menge an NAD⁺ im Zelllysat gezogen werden.

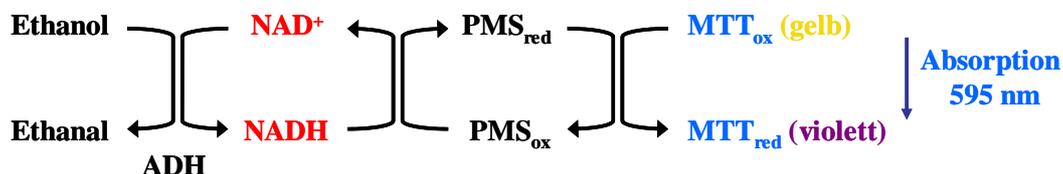


Abb.: Enzyme cycling assay zur Quantifizierung des NAD⁺-Gehalts.

Durch die Aktivität der ADH wird Ethanol zu Ethanal unter Verbrauch von NAD⁺ umgesetzt. Das dabei gebildete NADH wird durch Reduktion von PMS wieder zu NAD⁺ regeneriert. Oxidiertes MTT kann nun das reduzierte PMS wieder oxidieren. Dieser letzte Schritt führt zu einem Farbumschlag von gelbem oxidierten MTT nach violetterem reduzierten MTT, das man im Photometer bei der Wellenlänge 595 nm quantifizieren kann. Da der Farbumschlag auch bei der Wellenlänge 570 nm gemessen werden kann

und das vorhandene Photometer eine Messung bei 595 nm nicht unterstützt, werden die Messungen bei 570 nm durchgeführt.

Dieser Versuch wird an LCL von Spendern durchgeführt, die Träger des Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) *XRCC1* Arg280His sind. Die Zellen werden nach Behandlung geerntet. Jeweils eine Probe bleibt als Kontrolle unbehandelt. Das Zellsediment wird gründlich in 500 µl 100 mM Kaliumphosphat TCA-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation für 5 min bei 12000 x g und 4 °C. Der Überstand wird abgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl Kaliumhydroxid-Tris-Puffer überführt. 200 µl des so neutralisierten Zelllysats werden in ein Reaktionsgefäß mit 900 µl Reaktionsmix pipettiert, mit 100 µl ADH versetzt und gemischt, um die Reaktion zu starten. Nach Inkubation von 10 – 30 min bei 30 °C im Dunklen und anschließendem Abkühlen kann die Absorption des Reaktionansatzes bei 570 nm im Photometer gegen eine Leerprobe (*blank*), die kein Zelllysate enthält, gemessen werden.

8.4.1/1 Protokoll: Basenexcisions-Reparatur

5 x BER-Puffer (BER-Assay)

250 mM HEPES (pH 7.5)
2,5 mM EDTA
10 mM DTT
100 mM KCl
20 mM ATP
25 mM Phosphocreatin
2,5 mM NAD
0,5 mM ddTTP
Lagerung bei -20 °C möglich
Vor Verwendung 100 µg/ml Creatinphosphokinase (PCK) frisch zugeben

BER-TBE (BER-Assay)

5,34 ml 1 M Tris pH 8.8
5,34 ml 1 M Borsäure
0,24 ml 0,5 M EDTA

DNA Auftragspuffer (BER-Assay)

95% Formamid
20 mM EDTA
0,02% (w/v) Bromphenolblau
0,02% Xylencyanol

18% PAA Gel (denaturierend, BER-Assay)

18% AA/BisAA 20%/1%
8 M Urea
89 mM Tris-HCl (pH 8,8)
89 mM Borsäure
2 mM EDTA
0,1% APS
0,005% TEMED

Puffer I (BER-Assay)

10 mM Tris-HCl, pH 7.8
200 mM KCl
Proteaseinhibitor-Cocktail (frisch 10 µl pro 1 ml Puffer I zugeben)

Puffer II (BER-Assay)

10 mM Tris-HCl, pH 7.8
200 mM KCl
2 mM EDTA
40% Glycerin
0.2% NP-40
2 mM DTT
Proteaseinhibitor-Cocktail (frisch 10 µl pro 1 ml Puffer II zugeben)

10 x Reaktionspuffer A (BER-Assay)

500 mM Tris-HCl (pH 7,6)
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM EDTA

Die Basenexzisionsreparatur (BER) beruht im Wesentlichen auf zwei alternativen Reparaturwegen. Bei dem so genannten *short patch*-Reparaturweg wird an der Einzelstrang-Schadensstelle ein einziges Nukleotid ausgeschnitten und ersetzt, der *long patch*-Reparaturweg führt zur Neusynthese eines kurzen Strangabschnitts von zwei oder mehr Nukleotiden. Aufgrund dieser Tatsache können die verschiedenen BER-Wege anhand der vergleichenden Quantifizierung ihrer Reparaturprodukte untersucht werden.

5' - GTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGGC - 3' BER2
 3' - CATGGGCCCTAGGAGATCTUAGCTGGACGTCCCG - 5' BER1

Zugabe von
 ↓
 - Zellextrakt
 - [α -³²P]dCTP
 - ddTTP

A 3' - CATGGGCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCCG - 5' 35mer
B 3' - ddTCAGCTGGACGTCCCG - 5' 16mer
C 3' - dCAGCTGGACGTCCCG - 5' 15mer

Abbildung: Funktionsweise der vergleichenden Quantifizierung von Produkten der Basenexzisions-reparatur in Zellextrakten.

Der Reaktionsansatz enthält das dsDNA-Oligomer BER1/BER2. Durch Zugabe von Zellextrakt, [α -³²P]dCTP und ddTTP unter Bedingungen, die Reparatur ermöglichen, wird die Reparatur des fehlgepaarten Uracil durch die im Zellextrakt vorhandenen Proteine provoziert. Die Produkte der Reparatur sind

A: bei short patch-Reparatur ein radioaktiv markiertes Oligomer von 35 nt Länge.

B: bei long patch-Reparatur ein radioaktiv markiertes Oligomer von 16 nt Länge.

C: bei nicht abgeschlossenen Reparaturvorgängen ein radioaktiv markiertes Oligomer von 15 nt Länge.

Den Zellextrakten wird hierbei zur Reparatur ein dsDNA-Oligonukleotid von 35 nt Länge mit einem Basenaustausch von Cytosin nach Uracil an der Stelle bei 21 nt (BER1/BER2) zugegeben. Des Weiteren enthält der Reaktionsansatz ddTTP und [α -³²P]dCTP. Werden nun Bedingungen hergestellt, die DNA-Reparatur ermöglichen, wird sowohl im *short patch*-Reparaturweg als auch im *long patch*-Reparaturweg in das Oligonukleotid BER1 an Stelle des Uracil ein [α -³²P]dCTP eingebaut. Durch vorzeitiges Beenden der Reparatur des Schadens an dieser Stelle mittels Zugabe von EDTA und Erhitzen erhält man ein radioaktiv markiertes Oligomer von 15 nt Länge als Produkt. Es kann nicht unterschieden werden, ob der *short patch*-Reparaturweg oder der *long patch*-Reparaturweg stattgefunden hat. Wird das Reparaturereignis komplett vollzogen, erhält man für den jeweiligen Reparaturweg typische Produkte. Im Fall des *short patch*-Reparaturweges wird das fehlgepaarte Uracil ausgeschnitten, ein [α -³²P]dCTP eingebaut und der verbleibende SSB ligiert. Es resultiert ein radioaktiv markiertes Oligomer mit 35 nt Länge (AbbildungA). Bei dem *long patch*-Reparaturweg beginnt nach Einbau von [α -³²P]dCTP die Neusynthese eines kurzen Strangabschnittes. Da das folgende Nukleotid Thymin ist und im Reaktionsansatz ausschließlich ddTTP vorliegt, kann der Strang nicht weiter elongiert werden, es resultiert ein radioaktiv markiertes Oligomer mit 16 nt (AbbildungB). Diese Mischung aus Oligomeren von unterschiedlicher Länge kann mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden.

Um nun eine Aussage über die relative Menge des jeweiligen Reparaturproduktes treffen zu können, werden die zu untersuchenden Proben jeweils mit einer Kontrolle aufgetragen. Dieser Versuch wird an LCL von Spendern durchgeführt, die homozygote Träger des seltenen Allels des SNP *XRCC1* Arg280His sind. Die Kontrolle ist hierbei die LCL SiMö, die homozygot das häufige Allel des SNP aufweist. Des Weiteren wird der Versuch auch an hTERT-RPE-Zellen, die mit *XRCC1* siRNA transfiziert und für drei Tage bei 37 °C mit 5% CO₂ inkubiert werden, durchgeführt. Als Kontrolle dienen entsprechend hTERT-RPE-Zellen, die mit siNeg behandelt werden. Durch eine Zeitreihe kann sowohl der Beginn eines Reparaturereignisses als auch die Menge an Reparaturprodukt der jeweiligen Kontrolle mit einer Probe verglichen werden.

Annealing der DNA-Oligonukleotide

Bevor die Oligonukleotide BER1 und BER2 verwendet werden können, müssen die komplementären Stränge angelagert werden, um einen DNA-DSB von 35 Nukleotiden mit einem eingebauten Uracil an Stelle eines Thymins zu erhalten. Zu diesem Zweck werden gleiche Volumina von BER1 und BER2, die in gleicher Konzentration vorliegen, gemischt und mit 1/10 Volumen PCR-Puffer versetzt. Es erfolgt Erhitzen für 10 min auf 95 °C gefolgt von langsamem Abkühlen.

Vorbereitung der Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA

Da die Sephadex G-25 Füllung der Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA vorgequollen in einem STE-Puffer vorliegt, müssen die Säulen vor Verwendung getrocknet werden. Dazu werden gemäß der Packungsbeilage zunächst die Deckel an Ober- und Unterseite gelöst und die Säule in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit einem 1,5 ml Auffanggefäß platziert. Durch zweimalige Zentrifugation für 4 min bei 1100 x g mit jeweils anschließendem Verwerfen des Überstandes kann der Puffer vollständig entfernt werden. Die Säulen werden nun in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit einem neuen 1,5 ml Auffanggefäß überführt und können so verwendet werden.

Markierung der Standardoligonukleotide für die Quantifizierung von Produkten der Basenexzisionsreparatur

Die Markierung der Standardoligonukleotide, die als Größenmarker bei der Gelelektrophorese eingesetzt werden, erfolgt in drei Ansätzen (für das 15mer, das 16mer und das 35mer) mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK). Dieses Enzym ist eine Polynukleotid-5'-hydroxylkinase und katalysiert den Transfer eines Phosphats von ATP auf die 5'-OH-Gruppe der Oligonukleotide. Durch die Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wird eine radioaktive Markierung der Oligonukleotide erreicht.

Die Reaktionsansätze setzen sich aus 0,1 nM gelöstem Oligonukleotid, 1/10 Volumenteil des 10 x Reaktionspuffer A, 2 nM ATP, 10 U T4 PNK und 10 mCi/ml $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ zusammen und werden jeweils mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 20 μl aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37 °C für 20 min werden die Ansätze für 10 min auf 75 °C erhitzt und mit Hilfe von Sephadex G-25 Säulen aufgereinigt.

Herstellung von Zellextrakten

Nach Ernte und zweimaligem Waschen der Zellen in PBS (300 x g, 5 min) wird das Sediment in Puffer I (BER-Assay) aufgenommen, ein gleicher Volumenteil an Puffer II (BER-Assay) wird zugegeben. Eine Inkubation für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler schließt sich an, gefolgt von Zentrifugation bei 16000 x g, 4 °C für 30 min. Der Überstand wird abgenommen, und, falls er nicht sofort verwendet wird, in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren. In diesem Zustand kann er bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

Nachweis von Produkten der Basenexzisionsreparatur

Jeweils 1 μg Protein eines (mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf das gewünschte Volumen verdünnten) Zellextraktes wird mit einem entsprechenden Volumen 5 x BER-Puffer versetzt, um 1 x BER-Puffer im endgültigen Volumen des Ansatzes zu erhalten. Dazu werden 250 nM der DNA-Oligonukleotid-Mischung pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 mM MgCl_2 und 2,2 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ und Inkubation bei 37 °C wird die Reparatur gestartet. Die Reaktion wird in einer Zeitreihe nach jeweils 0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min durch Zugabe von 50 mM EDTA und Erhitzen auf 72 °C für 5 min terminiert. Bei Bedarf können zusätzliche Zeitpunkte eingeführt oder gestrichen werden. Da das Gel eine begrenzte Anzahl an Bahnen zum Probenauftrag aufweist und mit jeweils sechs Zeitpunkten pro Probe in einem Versuch nur eine Probe mit der Kontrolle

verglichen werden kann, werden in späteren Versuchen nur noch die Zeitwerte 0 min, 5 min, 10 min und 20 min berücksichtigt, um einen Vergleich von zwei Proben mit einer Kontrolle zu erreichen. Das Volumen jeder Probe wird nun mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 50 μl aufgefüllt, um sie in vorbereitete Aufreinigungssäulen für radioaktiv markierte DNA auftragen zu können. Die Säulen werden mit den Proben für 4 min bei 1100 x g zentrifugiert. Das aufgereinigte Produkt liegt nun im 1,5 ml Auffanggefäß vor und wird mit gleichem Volumen DNA-Auftragspuffer für den Nachweis von BER-Produkten versetzt, die Säule kann verworfen werden. Nach Erhitzen auf 72 °C für 2 min können die Proben zusammen mit einem Marker, der zu gleichen Anteilen markierte Oligonukleotide von 15 nt, 16 nt und 35 nt Länge aufweist, auf ein denaturierendes 18% PAA Gel von 35 cm Länge aufgetragen werden.

Um eine bessere Auftrennung zu gewährleisten, sollte das Gel zunächst einen Vorlauf für 30 min bei 600 V, 25 mA, 100 W durchlaufen, bevor die Proben aufgetragen werden. Die Auftrennung der Proben erfolgt dann für 3,5 h bei 600 V, 25 mA, 100 W.

Um die markierten Oligonukleotide sichtbar zu machen, wird das Gel luftdicht in eine Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Dieser wird je nach Stärke des Signals für 3 h bis mehrere Tage exponiert und entwickelt.

8.5.1.2 Protokoll Protein-Assay: Western Blotting und Quantifizierung:

Gesamtprotein wurde aus EBV-immortalisierten Lymphozyten isoliert, die vorher mit 4 Gy bestrahlt und nach 2, 4 bzw. 6 Stunden Zellkultur (= Reparaturzeit für DNA-Schäden) geerntet wurden. Als Kontrolle dienen unbestrahlte Lymphozyten mit gleicher Zellzahl. Für das Western Blotting wird eine Proteinmenge eingesetzt, die jeweils 1×10^5 Lymphozyten entspricht.

Die Expressionsstärke der untersuchten Proteine wird mit Hilfe des Programms Quantity One (BioRad) quantifiziert. Die p53-Signale wurden durch Verrechnen mit dem jeweiligen Actin-Signal normiert und die IR-Induktion der (normierten) p53-Expression dargestellt (s.u.).

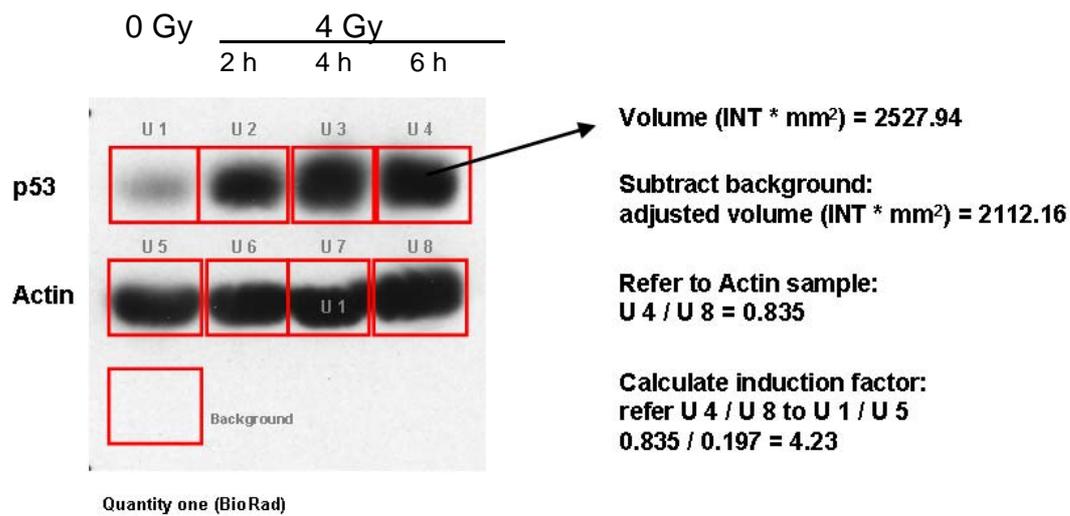


Abbildung: Nach Einscannen der Original-Filme wurden gleiche Areale über die Proteinbanden gelegt. Der Schwärzungsgrad jeder Bande wurde zunächst mit dem Hintergrund (background) verrechnet. Das Verhältnis der P35-Banden zu den jeweiligen darunterliegenden Actin-Banden (Ladekontrolle) wurde ermittelt. Die p53-Proteinmengen der bestrahlten Proben wurden in Relation zur unbestrahlten Kontrolle als Induktionsfaktor ermittelt. (Zur optischen Illustration wurde hier ein überexponierter Film dargestellt.)

8.5.2 Protokoll Sequenzierung

Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs

PCR-Produkte/Plasmide wurden nach dem Sanger-Coulson-Verfahren des Kettenabbruchs unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits, Applied Biosystems, sequenziert. Die dabei entstandenen Fragmente verschiedener Länge wurden auf einer Kapillarsequenziermaschine „ABI Prism® 3730xl DNA Analyser“ elektrophoretisch getrennt und detektiert.

Für die Sequenzierreaktion wurde das folgende, vom Hersteller empfohlene, PCR-Programm genutzt:

Schritt	Funktion	Zeit	Temperatur
1	Initiales Denaturieren	1 min	95°C
2	Denaturieren vor Annealing	0,5 min	95°C
3	Annealing	0,5 min	55°C
4	Elongation	2 min	60°C
5	Gehe zu Schritt 2	24x	
6	Abkühlung	1min	18°C

Der Sequenzierungsansatz beinhaltet 5µl HPLC-Wasser, 1µl 5x BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (Sequenzierpuffer), 1µl Primer, 1µl Template (PCR-Produkt/Plasmid) und 2µl Ready Reaction Mix (enthält dNTPs, markierte ddNTPs und die Polymerase).

Jedes ddNTP besitzt dabei einen eigenen Markerfarbstoff, der bei einer anderen Wellenlänge fluoresziert. Das ddATP ist mit dichloro[R6G] (grün), das ddCTP mit dichloro[ROX] (rot), das ddGTP mit dichloro[R110] (blau) und das ddTTP mit dichloro[TAMRA] (gelb) markiert. Aus den dadurch erzeugten spezifischen Farbbanden wird durch die ABI-Sample-Software die Nukleotidsequenz bestimmt.

Material:

Sequenzierpuffer	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems
Ready-Reaction-Mix	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz