

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. med. Holger Höhn

# **Validierung der Zellzyklusdiagnostik bei Ataxia telangiectasia**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Tilman Heinrich  
aus München

Würzburg, Mai 2005

Referent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Schindler

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2005

Der Promovend ist Arzt.

# **INHALT**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Klinik der Ataxia telangiectasia	1
1.2	Diagnose der Erkrankung	2
1.3	Genetische Grundlagen	2
1.4	Rolle von ATM bei der Erkennung und Behebung von DNA-Schäden	3
1.5	Der Zellzyklus und die Rolle von ATM	4
1.6	Fragestellung	5
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>6</b>
2.1	Isolation von Lymphozyten	6
2.2	Zellkultur und Bestrahlung	6
2.3	Zellfärbung	7
2.4	Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse	7
2.5	Mutationsanalyse	10
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>11</b>
3.1	Zweiparametrische Darstellung der Untersuchungsergebnisse	11
3.2	Unterscheidung zwischen sicher AT-positiven und AT-negativen Fällen	12
3.3	Dreiparametrische Darstellung der Untersuchungsergebnisse	13
3.4	Altersverteilung	14
3.5	AFP-Werte als Funktion des Lebensalters	15
3.6	Falldarstellungen	16
	Gruppe I: AT-negative Kontrollen	16
	Gruppe II: AT-positive Fälle	24
	Gruppe III: Besonderheiten	44
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
4.1	Methoden der Diagnostik	65
4.2	Das Verfahren der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse	66
4.3	Schlussfolgerungen	69
4.3.1	Konkordanz zwischen durchflusszytometrischer und molekulargenetischer Analyse	69
4.3.2	Optimierung der Diagnostik durch 3-Parameter-Analyse	70
4.3.3	Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren	71
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>75</b>



# 1 Einleitung

Ataxia telangiectasia (AT, Louis-Bar-Syndrom) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die zu den Chromosomenbruchsyndromen zählt. Diese zeichnen sich durch genomische Instabilität, erhöhte Prädisposition zur Entstehung von Neoplasien und eine frühe Sterblichkeit der Patienten aus. Die Instabilität beruht auf der Störung wichtiger zellulärer Mechanismen, die zum Erhalt der genomischen Integrität beitragen, wie etwa DNA-Reparatur, Kontrolle des Zellzyklus und Induktion von Apoptose.

## 1.1 Klinik der Ataxia telangiectasia

AT ist eine seltene Erkrankung mit einer Häufigkeit zwischen 1:300 000 und 1:40 000 [Shiloh 1997]. Klinisch zeichnet sich AT durch fortschreitende neuromotorische Dysfunktionen (Ataxie, okuläre Apraxie, verwaschene Sprache), Teleangiektasien, Wachstumsverzögerung, und vorzeitige Alterung aus [Gatti 2001]. Die cerebellare Ataxie tritt etwa ab einem Alter von 1–3 Jahren auf, viele Patienten sind bereits mit 10 Jahren auf einen Rollstuhl angewiesen. Teleangiektasien treten v. a. im Bereich der Augen und des Gesichts auf und manifestieren sich in der Regel einige Jahre später als die neurologischen Symptome. Bildgebende Verfahren (MRI) zeigen eine Atrophie des Kleinhirns, die neuropathologisch auf einer Degeneration von Purkinje-Zellen beruht [Tavani et al. 2003]. Häufig finden sich zelluläre und humorale Immundefizienzen, die zu wiederholt auftretenden Infektionen insbesondere der Atemwege führen. Kennzeichnend für AT ist weiterhin eine stark erhöhte Prädisposition zu malignen Tumoren, insbesondere zu Lymphomen und lymphozytären Leukämien [Taylor et al. 1996]. Bei der Therapie dieser Tumoren mittels Bestrahlung wurde bereits früh eine weitere charakteristische Eigenschaft der an AT Erkrankten festgestellt: Die stark erhöhte Strahlensensibilität der Patienten kann bereits in niedrig-konventionellen Dosen zu lebensbedrohlichen Konsequenzen führen [Gotoff et al. 1967]. Eine wirksame Therapie der Erkrankung ist gegenwärtig nicht verfügbar, von großer Bedeutung ist die Vermeidung der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung. Neuere Ansätze beschäftigen sich mit der Möglichkeit der Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege, welche den Ausfall der ATM-Protein-Funktionen wenigstens teilweise kompensieren sollen [Shiloh et al. 2004].

## 1.2 Diagnose der Erkrankung

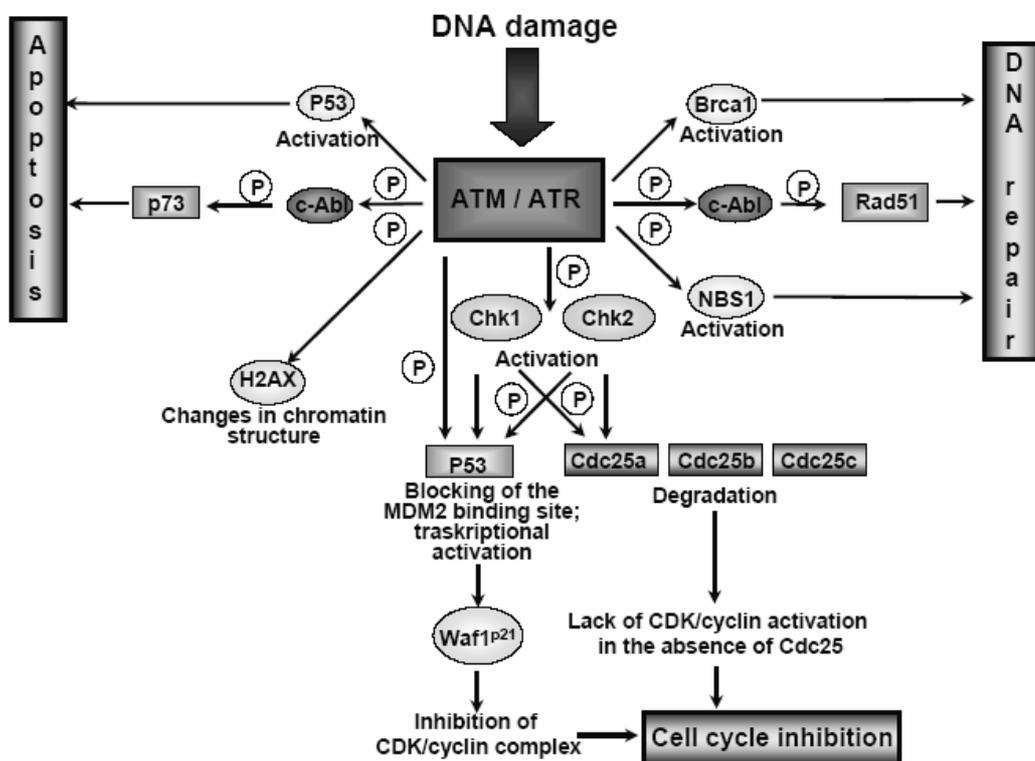
Die Diagnose der Erkrankung stützt sich neben dem klinischen Bild v.a. auf folgende Befunde: Patienten mit AT weisen in der Regel erhöhte Blutspiegel von AFP ( $\alpha$ -Fetoprotein) auf, teilweise ist auch der CEA-Wert erhöht (carcinoembryonales Antigen). Häufig finden sich erniedrigte Spiegel von Immunglobulinen (IgG, IgE und IgA) sowie eine verminderte Zellzahl an B- und/oder T-Lymphozyten [Nowak-Wegrzyn et al. 2004]. Auf zellulärer Ebene zeigen AT-Zellen häufig Chromosomenaberrationen (Telomerfusionen, Inversionen, Translokationen), die u.a. die Chromosomen 7 und 14 betreffen [Koijs et al. 1991]. AT-Zellen sind sehr empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung und Radiomimetika wie Bleomycin, deren Einwirkung zu einer gegenüber gesunden Kontrollen stark erhöhten Chromosomenbruchrate führt. Zur klinischen Diagnostik der Strahlenempfindlichkeit wurde 1994 eine Methode vorgeschlagen, die das Überleben bestrahlter Kulturen lymphoblastoider Zellen quantifiziert, der „colony survival assay“ (CSA) [Huo et al. 1994]. Weiterhin stehen nach der Identifizierung des ATM-Gens auch die – relativ aufwendigen – Methoden der Mutationsanalyse [Telatar et al. 1996, Sandoval et al. 1999, Thorstenson et al. 2001, Buzin et al. 2002, Mitui et al. 2003] sowie ATM-Protein-Analytik (Immunoblot) zur Verfügung [Becker-Catania et al. 2000, Chun et al. 2003].

## 1.3 Genetische Grundlagen

Das für die Erkrankung AT verantwortliche Gen, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), wurde 1995 identifiziert [Savitzky et al. 1995]. Das ATM-Gen erstreckt sich über 150 kb auf Chromosom 11q22-23 und enthält 66 Exons. Sein Primärtranskript hat eine Länge von 13 kb, die kodierende Region ist 9171 bp lang [Platzer et al. 1997]. Über 400 Mutationen des ATM-Gens sind mittlerweile identifiziert worden, sie sind abrufbar im Internet unter [www.benaroyaresearch.org/bri\\_investigators/atm.htm](http://www.benaroyaresearch.org/bri_investigators/atm.htm). Diese Mutationen treten über die gesamte Länge des Gens verteilt auf und bestehen aus Deletionen, Mutationen oder dem Austausch einzelner Nukleotide. Der überwiegende Teil der ATM-Mutationen führt zu einer Trunkierung des ATM-Proteins durch Nonsense- und Splice-Mutationen, neuere Arbeiten geben einen Prozentsatz von 86% Trunkierung gegenüber 14% Missense-Mutationen an [Buzin et al. 2002]. Ein verkürztes ATM-Protein ist offenbar instabil und unterliegt einem intrazellulären Abbau, sodass der Nachweis von ATM-Protein in den Zellen der meisten klassischen AT-Patienten negativ ausfällt [Chun et al. 2003].

## 1.4 Rolle von ATM bei der Erkennung und Behebung von DNA-Schäden

Das ATM-Genprodukt ist ein Protein, das eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden spielt [Shiloh 2003; Kastan und Lim 2000]. Das ATM-Protein ist mit 3057 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 360 kDa eines der grössten bekannten menschlichen Proteine. Es wird zur Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinasen gezählt, die Kinaseaktivität besteht in der Phosphorylierung anderer Proteine an Serin- oder Threonin-Positionen. Der Mechanismus der Aktivierung des ATM-Proteins wurde erst in jüngster Zeit aufgeklärt, er umfasst eine intermolekulare Autophosphorylierung und Dissoziation der primär als Dimere vorliegenden ATM-Protein-Komplexe [Bakkenist und Kastan 2003]. Nach einer Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlen wird durch das aktivierte ATM-Protein eine Reihe von Ziel-Proteinen phosphoryliert und damit aktiviert. Hierzu zählen z.B. die Zellzyklusproteine Chk1 und Chk2 sowie weitere Proteine wie NBS1, Brca1 und p53. Die Stimulation dieser Proteine führt dann – z.T. vermittelt durch die Aktivierung weiterer Proteine – in Abhängigkeit von der Schwere der DNA-Schädigungen zur Arretierung der Zellen in der G1- bzw. G2-Phase und Reparatur der Schäden oder zur Induktion von Apoptose (Abb. 1.1).

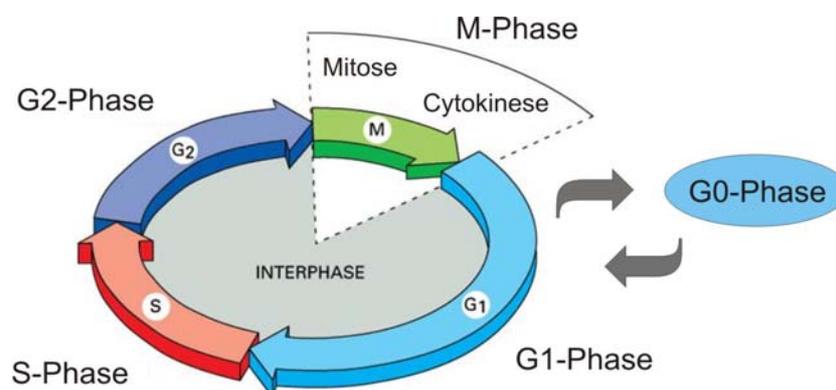


M. Christmann et al., Toxicology 193 (2003) 3–34

**Abb. 1.1** Die Rolle von ATM (und ATR: ATM-related protein) bei der Regulation von DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Induktion von Apoptose nach der Erkennung von DNA-Schädigungen.

## 1.5 Der Zellzyklus und die Rolle von ATM

Der Zellzyklus umfasst die grundlegenden Prozesse von Wachstum und Vermehrung einer Zelle. Hier finden die Verdopplung der DNA und Weitergabe an zwei genetisch identische Tochterzellen statt. Die DNA-Synthese findet in der S-Phase, die Aufteilung der DNA in der M-Phase statt, welche aus Mitose (Aufteilung der Chromosomen) und Cytokinese (Teilung der Zelle) besteht. Die zwischen diesen beiden Phasen liegenden Abschnitte werden als Gap-Phasen (G1 und G2) bezeichnet. G1-, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. Einen länger dauernden bzw. endgültigen Ruhezustand der Zelle bildet die G0-Phase. Der Zellzyklus unterliegt einer komplexen Regulation, wichtige Kontrollpunkte befinden sich vor Beginn der S-Phase (G1/S-Checkpoint), am Anfang (G2/M-Checkpoint) sowie am Ende der M-Phase (M-Checkpoint). An diesen Punkten kann der Zyklus angehalten werden, falls es im vorangegangenen Ablauf zu Störungen gekommen ist. Dies ist z.B. nach Schädigung der DNA durch Chemikalien oder ionisierende Strahlung der Fall, eine Verzögerung an den Kontrollpunkten soll der Zelle Zeit geben, diese Schäden zu reparieren. Bei dieser Kontrolle des Zellzyklus spielt das ATM-Protein (zusammen mit verwandten Proteinkinasen) eine Schlüsselrolle (vgl. Kap. 1.4). Bei an AT Erkrankten hat der Funktionsverlust des ATM-Proteins zur Folge, dass die Phosphorylierung (und Aktivierung) verschiedener Proteine wie Chk1, Chk2, p53 oder Cdc25 nach dem Einfluss schädigender ionisierender Strahlung ausbleibt. Zu den Normalfunktionen dieser Proteine gehört u.a. die Gewährleistung des G1/S- bzw. G2/M-Überganges innerhalb des Zellzyklus, der Funktionsausfall kann also in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung, d.h. in welcher Phase des Zellzyklus sich die bestrahlten Zellen befinden, zu einer Arretierung der Zellen an verschiedenen Punkten des Zellzyklus führen. Für die Erkrankung AT ist u.a. nach Strahlenexposition eine Blockierung von Zellen in der G2-Phase charakteristisch [Beamish und Lavin 1994; Scott et al. 1994]. Diese Blockierung lässt sich mittels durchflusszytometrischer Analyse nachweisen (Kap. 2.4).



**Abb. 1.2** Phasen des Zellzyklus [modifiziert nach Alberts et al. 2004].

## 1.6 Fragestellung

Aus zellkinetischer Sicht weisen Zellen von AT-Patienten zwei prominente Störungen auf [Seyschab et al 1992]:

- 1) Aufgrund der Störungen des Immunsystems ist die Mitogen-Antwort peripherer mononukleärer Blutzellen erheblich reduziert. In der Zellzyklusanalyse von 72h-Kulturen manifestiert sich die defekte Mitogen-Antwort als persistente Erhöhung der G0/G1-Phase.
- 2) Nach Bestrahlung kommt es zu einer überproportionalen Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus als mutmaßlicher Ausdruck der gestörten DNA-Reparaturmechanismen in AT-Zellen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Auswertung von 327 Fällen, die im Rahmen der Verdachtsdiagnose einer AT-Erkrankung mit dem Verfahren der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse untersucht wurden. Es sollte hierbei der Frage nachgegangen werden, inwieweit dieses Verfahren geeignet ist, eine Differenzierung zwischen AT-positiven Fällen und AT-negativen Fällen zu leisten. Dies sollte unter Einbeziehung zusätzlicher diagnostisch relevanter Parameter (z.B. AFP-Wert) geschehen und insbesondere einen Vergleich der hier angewandten Methode mit weiteren gegenwärtig verfügbaren diagnostischen Verfahren ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Isolation von Lymphozyten

Als Ausgangsmaterial für die durchgeführten Untersuchungen wurde heparinisiertes Vollblut eingesetzt. Das im Rahmen der klinisch-genetischen Routinediagnostik gewonnene Blut wurde auf dem Postweg bzw. durch Kurierdienste verschickt und soweit möglich innerhalb von 24h-48h nach Blutentnahme aufgearbeitet. Die Isolation der Lymphozyten im Labor erfolgte unter sterilen Bedingungen mittels der Ficoll-Paque-Technik. Hierbei wurde zunächst das autologe Serum durch Zentrifugation vom Plasma abgetrennt und durch ein entsprechendes Volumen an HBSS (Hank's Balanced Salt solution) ersetzt. Die erhaltene Suspension wurde im Verhältnis 1:2 mit HBSS verdünnt und jeweils 3 ml Ficoll-Paque wurden mit 4–10 ml dieser Suspension überschichtet. Nach Zentrifugation wurde der HBSS-Überstand verworfen und die in einer dünnen Zwischenschicht angereicherten Lymphozyten vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in HBSS resuspendiert. Das nach mehrmaliger Waschung und Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde in RPMI 1640 Kulturmedium suspendiert und diese Suspension auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt (Zellzählung nach Verdünnung mit 1%iger Essigsäure im Verhältnis 1:2 in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer).

### 2.2 Zellkultur und Bestrahlung

Das Medium für die Zellkultur setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

RPMI 1640	3.56 ml
AS (autologes Serum; 1%)	0.05 ml
FCS (fetales Kälberserum; 15%)	0.75 ml
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin; $10^{-4}$ M)	0.05 ml
DC (2-Desoxycytidin; $10^{-4}$ M)	0.05 ml
$\alpha$ TG ( $\alpha$ -Monothioglycerol; $2 \times 10^{-5}$ M)	0.01 ml
PHA (Phytohämagglutinin; 1.2 $\mu$ g/ml)	0.0225 ml

Von diesen Bestandteilen wurden zunächst RPMI 1640, AS und FCS in Kulturflaschen vorgelegt und die isolierten Lymphozyten dann in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingesät. Die Kulturen wurden anschließend mit verschiedenen Strahlendosen bestrahlt (0.5 Gy, 1.5 Gy, 2.5 Gy, 4 Gy); dabei stellt die Dosis von 1.5 Gy i.a. die diagnostisch relevante Strahlendosis dar. Die

Bestrahlung erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg (Leiter Prof. Dr. med. M. Flentje) an einem Gerät des Typs Theratron 780 IEC. Parallel dazu wurde jeweils eine Kontrolle ohne Bestrahlung mitgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die weiteren Kulturmedien hinzugefügt, die Kulturflaschen zum Ausschluss von Licht mit Aluminiumfolie umhüllt und 72 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, durch Zentrifugation isoliert und in einem Medium bestehend aus RPMI (80%), FCS (10%) und DMSO (10%) aufgenommen. Die so vorbereiteten Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Messung bei –20 °C aufbewahrt.

### 2.3 Zellfärbung

Die eingefrorenen Zellproben wurden im Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt, zentrifugiert, das gewonnene Pellet in Hoechst 33258-Färbepuffer (1.2 µg/ml) bei 4 °C suspendiert ( $4 \times 10^5$  Zellen/ml) und 15 min inkubiert. Danach wurde Ethidiumbromid-Färbepuffer zugegeben und erneut 15 min inkubiert. Diese Färbeschritte sowie die anschließende Aufbewahrung der Proben bis zur durchflusszytometrischen Messung fanden bei indirektem Licht bzw. im Dunkeln statt, um lichtinduzierte Chromosomenalterationen zu vermeiden. Der Färbepuffer für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-HCL (0.1 M, pH 7.4)	10 ml
NaCl (0.154 M)	10 ml
MgCl <sub>2</sub> (0.5 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 mM)	1 ml
Nonidet P40 (0.1%)	1 ml
BSA (bovines Serumalbumin, 0.2%)	0.2 g
Ampuwa (demineralisiertes Wasser)	ad 100 ml

### 2.4 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse

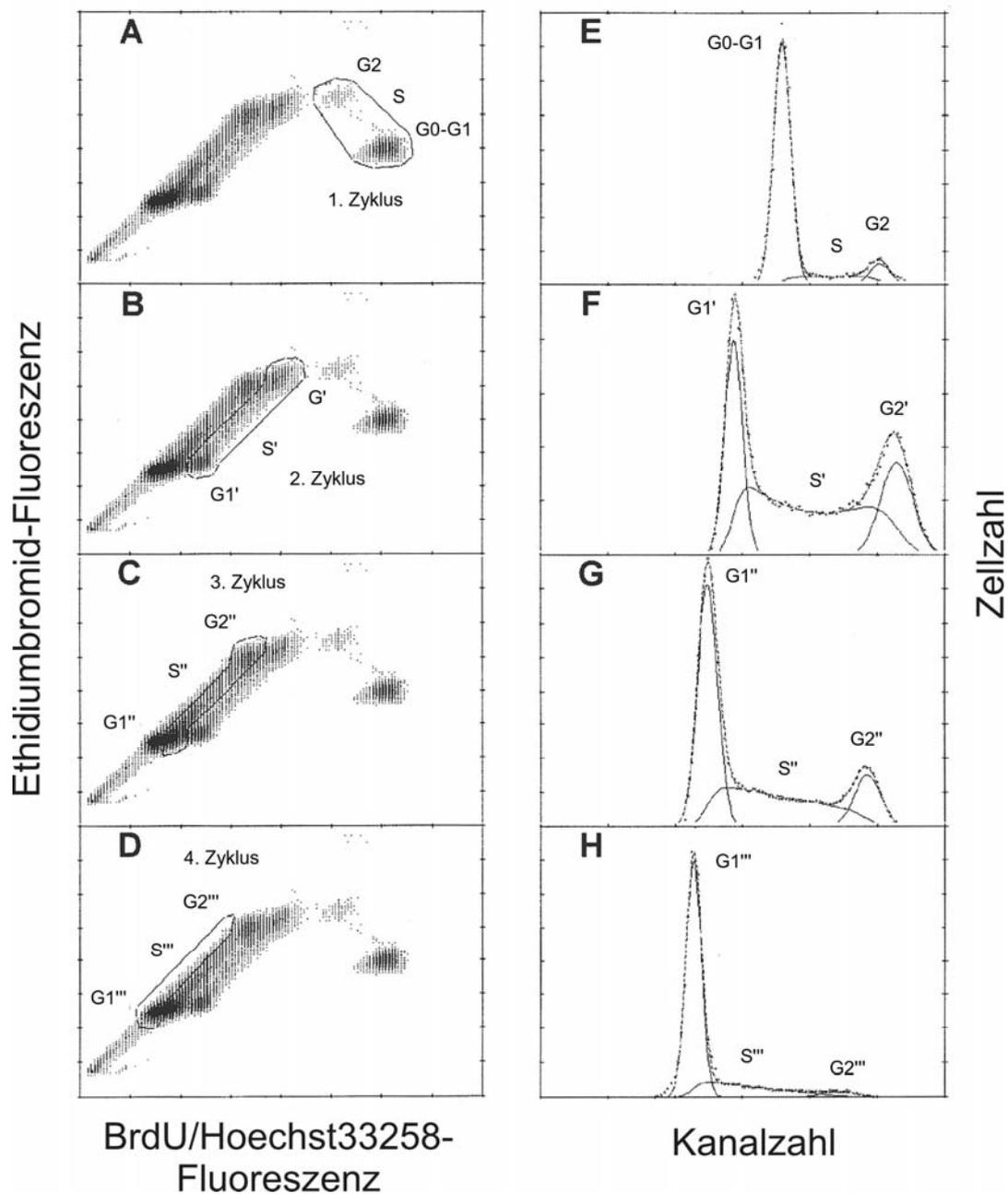
Die Teilchen einer Zellsuspension können mittels der Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Hierzu werden die zu untersuchenden Partikel mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Anregung eines Fluorochroms in fluoreszenzmarkierten Zellen führt zur Aussendung von energieärmerem Licht (Verschiebung

des Emissionsspektrums zu längeren Wellenlängen; Stokesche Regel), wobei die Intensität des emittierten Lichtsignals proportional der Menge des vorhandenen Farbstoffes ist. Werden mehrere Fluorochrome verwendet, so können zur Auftrennung der resultierenden Fluoreszenzsignale Filter- und Spiegelsysteme verwendet werden. Diese leiten das nach Wellenlängen aufgetrennte Licht zu Detektoren (Photomultiplier) weiter, an denen Verstärkung und Umwandlung der Lichtimpulse in elektrische Signale erfolgt. Im vorliegenden Fall wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33258 und Ethidiumbromid verwendet. Hoechst 33258 ist ein nicht-interkalierendes Fluorochrom, welches sich bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der DNA bindet, Ethidiumbromid ein interkalierendes Molekül, das sich in DNA-Doppelstränge einlagert und mit diesen einen fluoreszierenden Komplex bildet. Die Fluoreszenzintensität einer Probe im für den jeweiligen Farbstoff charakteristischen Frequenzbereich (Hoechst 33258: 450–500 nm; Ethidiumbromid: > 600 nm) ist daher proportional der enthaltenen DNA-Menge. Innerhalb des 1. Zellzyklus verdoppelt sich der DNA-Gehalt von proliferierenden Zellen von  $2n$  (G0 bzw. G1-Phase) zu  $4n$  (G2-Phase). Bei der anschließenden Zellteilung erfolgt dann wieder eine Reduktion auf einen Gehalt von  $2n$  (G1-Phase des 2. Zyklus). Hierdurch erhöht sich auch die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenzintensität zunächst um den Faktor 2 und fällt dann wieder auf den ursprünglichen Wert zurück. Für die fluorometrischen Zellzyklusanalysen wird das Kulturmedium mit BrdU versetzt. Dieses wird in der Synthesephase anstelle von Thymidin in die neu entstehende DNA-Kette eingebaut. Nach dem 1. Zellzyklus ist daher die neusynthetisierte DNA unifiliär BrdU-substituiert, so dass am Beginn des 2. Zellzyklus (G1-Phase) die Hoechst 33258-vermittelte Fluoreszenz auf die Hälfte des Ausgangswertes (G0 bzw. G1-Phase des 1. Zellzyklus) abgesunken ist. Dieses Phänomen wird als „Quench-Effekt“ bezeichnet. Bei zweidimensionaler Auftragung von BrdU/Hoechst-33258- und Ethidiumbromid-vermittelter Fluoreszenzintensität entsteht auf diese Weise ein Zellzyklusdiagramm, welches die Einordnung der untersuchten Zellen in jede Phase (G0,G1; S; G2) eines aufeinander folgenden Zellzyklus anhand des dem jeweiligen DNA-Gehalt und der replikativen Vergangenheit einer Zelle entsprechenden charakteristischen Verhältnisses der beobachteten Fluoreszenzintensitäten erlaubt.

Die Messung der Proben erfolgte an den Durchflusszytometern ICP 22 (Phywe) bzw. LSR1 (Becton-Dickinson). Die Auswertung der Diagramme erfolgt computergestützt mit Hilfe der Programme MULTI2D/MCYCLE bzw. MPLUS. Jeder einzelne Zellzyklus wird interaktiv manuell eingerahmt und auf eine zu dieser zweidimensionalen Region parallelen Achse projiziert. Hierdurch entstehen eindimensionale Kurven (DNA-Histogramme), die nach ihren G1-, S- und G2-Phasenanteilen ausgewertet werden. Man erhält somit die Verteilung der Zellen in den

einzelnen Zellzykluskompartimenten sowie weitere für die diagnostische Beurteilung wichtige Parameter wie etwa den Anteil proliferierender Zellen (growth fraction, GF) [Schindler und Hoehn 1999, Schindler und Soback 1999, sowie hierin zitierte Literatur].

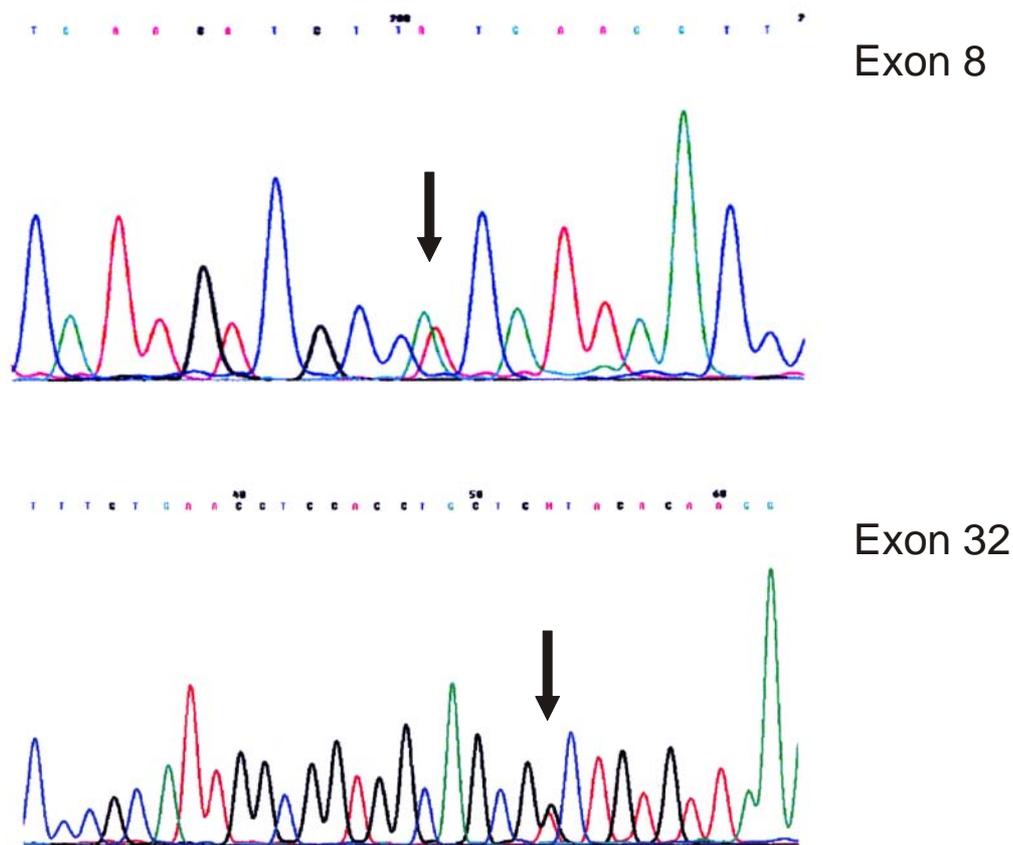
Die Abbildungen 2.1/A–D zeigen repräsentative Zytogramme. Auf der X-Achse ist jeweils die BrdU/Hoechst-33258-, auf der Y-Achse die Ethidiumbromid-vermittelte Fluoreszenz aufgetragen. Die einzelnen Zellzyklen sind durch Einkreisen kenntlich gemacht. Die Abbildungen 2.1/E–H geben die zugehörigen eindimensionalen Histogramme wieder, aus denen sich der Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G0 bzw. G1, S, G2) ablesen bzw. basierend auf einem mathematischen Modell („Kurvenfit“) errechnen lässt.



**Abb. 2.1** Zellzyklusanalyse: Zytogramme (A–D) und Histogramme (E–H) [modifiziert nach Schindler und Hoehn 1999]

## 2.5 Mutationsanalyse

Die DNA-Isolation erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Boehringer Mannheim). Die zu untersuchenden Exons wurden mit Hilfe von PCR (polymerase chain reaction) unter Verwendung der entsprechenden Primer amplifiziert und anschließend sequenziert. Alle zur Sequenzierung notwendigen Reagenzien außer Primer und Template sind im ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Kit (PE Biosystems) enthalten. Zur Amplifikation wird die thermostabile AmpliTaq-DNA-Polymerase verwendet. Zur automatischen Sequenzierung wird der ABI PRISM 310 Genetic Analyser verwendet (Abb. 2.2). Die Primer für die Exons der jeweiligen ATM-Gene sowie nähere Einzelheiten finden sich in den entsprechenden Publikationen [Sandoval et al. 1999; Oppitz et al. 1999].

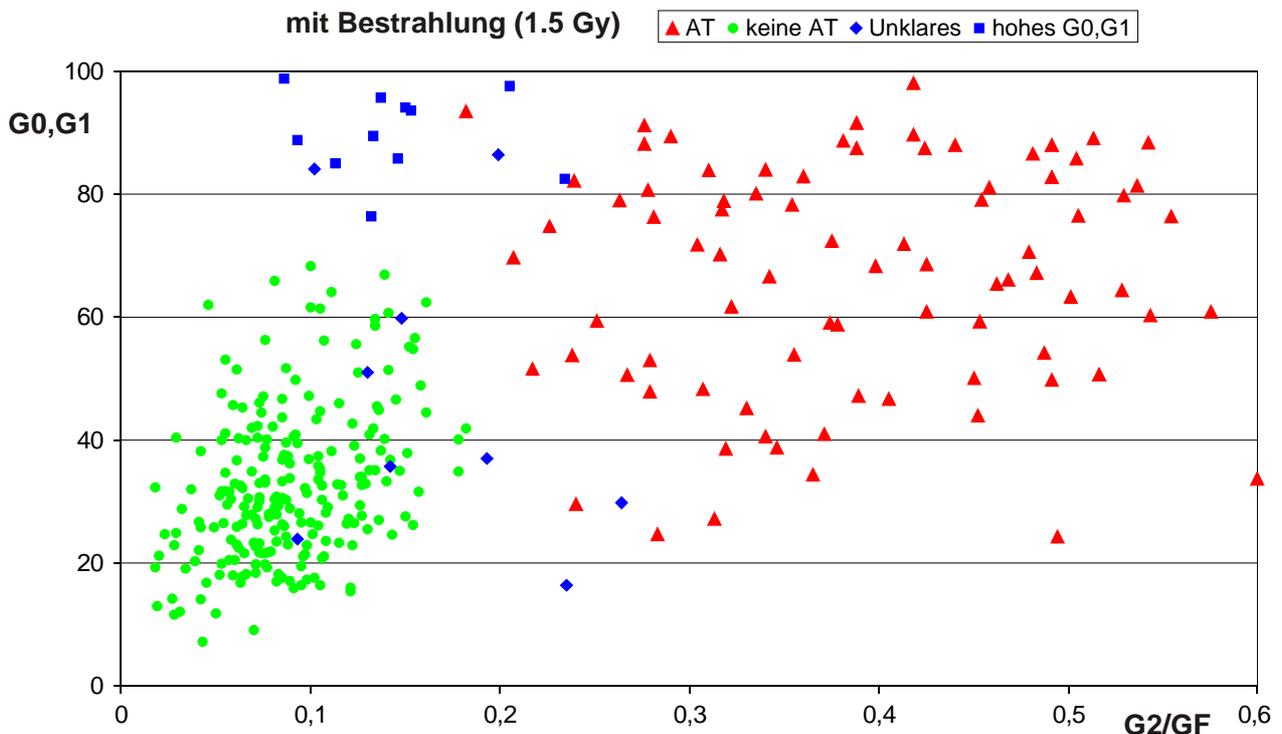


**Abb. 2.2** Zwei ATM-Gen-Mutationen bei einem AT-Patienten (Compound-Heterozygotie): Exon 8, 538C>T; Exon 32, 4587T>G.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zweiparametrische Darstellung der Untersuchungsergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten von 327 Patienten mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia ausgewertet. Hierbei ergab sich in 82 Fällen eine Bestätigung der Verdachtsdiagnose, in 225 Fällen konnte das Vorliegen dieser Erkrankung ausgeschlossen werden. In weiteren 20 Fällen konnte die Verdachtsdiagnose nicht bestätigt werden, jedoch zeigten sich in der durchgeführten Zellzyklusanalyse Auffälligkeiten hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der untersuchten Zellen, ihrer Strahlensensitivität oder anderer Parameter. In Abb. 3.1 ist das Ergebnis der Zellzyklusanalysen aller bearbeiteten Fälle in einer Darstellung wiedergegeben, bei der die Abszisse das Verhältnis des Anteils von Zellen in der G0-Phase zum Anteil proliferierender Zellen (Ratio G2/GF) repräsentiert und auf der Ordinate der in der G0- bzw. G1-Phase des 1. Zellzyklus verbliebene Anteil von Zellen aufgetragen ist. AT-positive Fälle zeigen charakteristischerweise ein erhöhte Strahlensensitivität und einen erhöhten Anteil nicht-prolierender Zellen. Demgegenüber sind für AT-negative Proben eine geringe Strahlensensitivität sowie eine in der Regel bessere Zellproliferation kennzeichnend. Diese zweiparametrische Auftragung erlaubt bereits eine gute Abgrenzung der AT-positiven gegen AT-



**Abb. 3.1** Übersicht über die behandelten Fälle: Auftragung des Prozentsatzes nicht-prolierender Zellen (G0,G1) gegen die Strahlensensitivität (G2/GF).

negative Fälle. Daneben gibt es jedoch auch Sonderfälle, die z.B. einen besonders hohen Anteil von Zellen in der G0,G1-Phase oder eine grenzwertige Strahlensensitivität aufweisen.

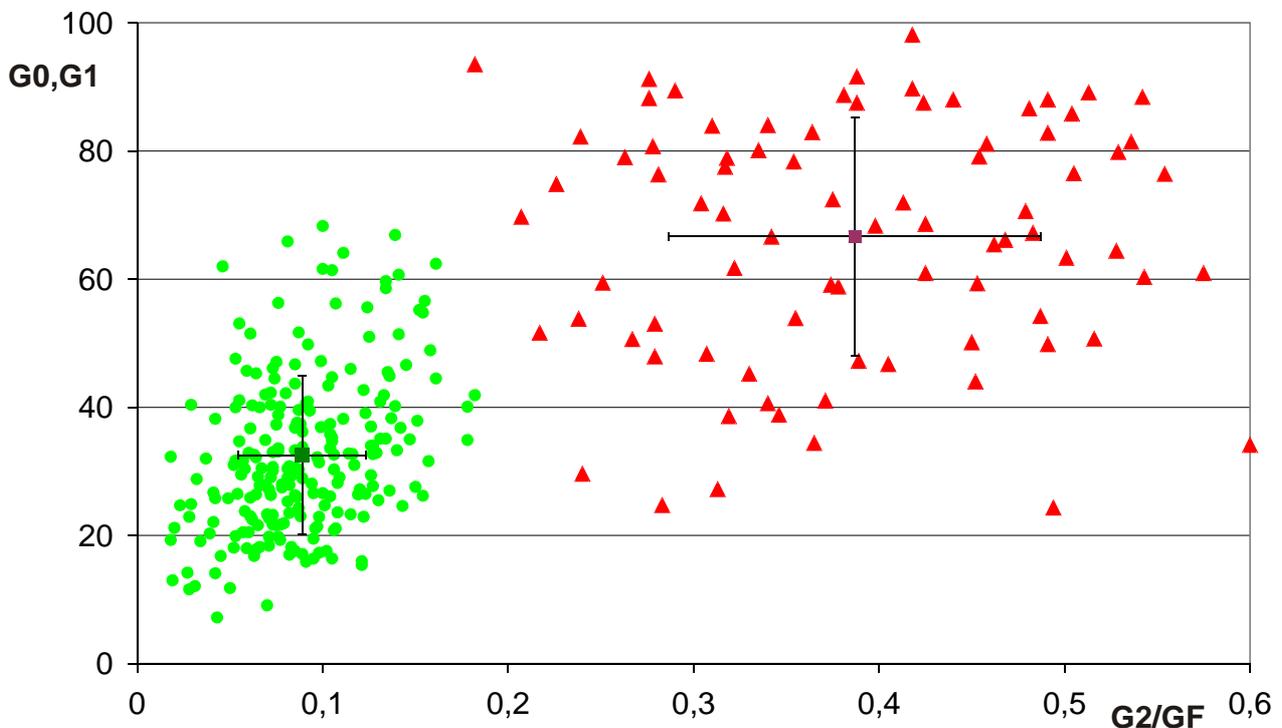
### 3.2 Unterscheidung zwischen sicher AT-positiven und AT-negativen Fällen

Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung (SD) in der Gruppe der AT-Fälle ergibt folgende Werte (Tab. 1; vgl. auch Abb. 3.2):

*Tabelle 1*

		keine AT	AT
<b>G0,G1</b>	Mittelwert	32,54	66,64
	SD	12,32	18,68
<b>G2/GF</b>	Mittelwert	0,09	0,39
	SD	0,03	0,10

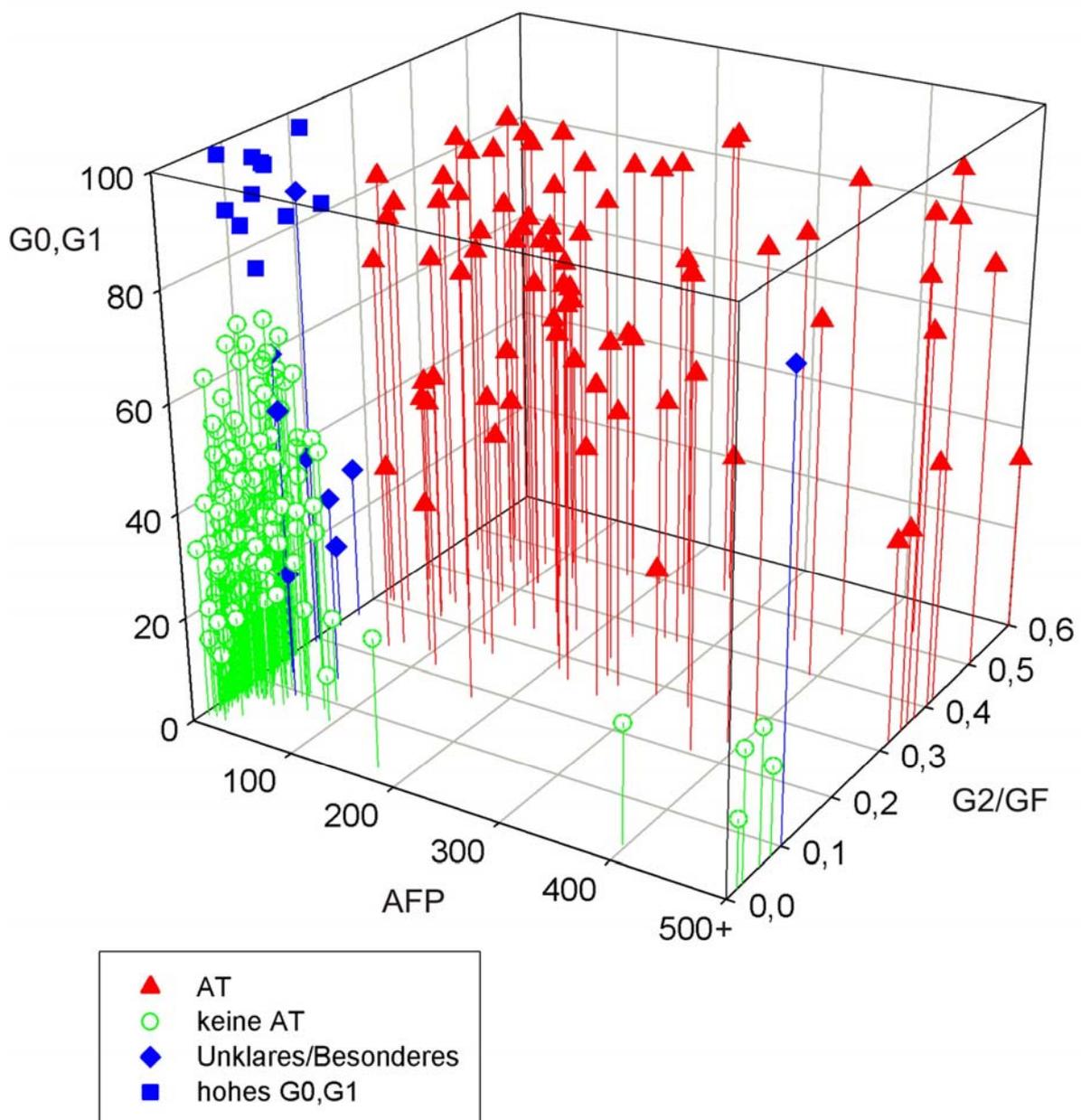
Wie aus Tab. 1 und Abb. 3.2 ersichtlich, findet sich in der Gruppe der AT-Fälle eine deutlich größere Streuung sowohl bezüglich des Anteils nicht proliferierender Zellen (G0,G1) als auch der Radiosensitivität (G2/GF) der untersuchten Proben.



**Abb. 3.2** Übersicht über die behandelten Fälle: Auftragung des Prozentsatzes nicht-prolierierender Zellen (G0,G1) gegen die Strahlensensitivität (G2/GF). Mittelwert und Standardabweichung der AT-positiven und AT-negativen Fälle sind ebenfalls eingetragen.

### 3.3 Dreiparametrische Darstellung der Untersuchungsergebnisse

Noch genauer wird die Trennschärfe bei Berücksichtigung eines dritten Parameters, nämlich des AFP-Wertes. Dieser ist bei AT charakteristischerweise erhöht. In Abb. 3.3 ist die Projektion einer dreidimensionalen Auftragung der Werte G2/GF, G0,G1 und AFP gezeigt. Die Abbildung lässt einen relativ scharf abgegrenzten Cluster für die AT-negativen Kontrollen erkennen. Die Berücksichtigung der Zusatzinformation AFP-Wert erlaubt darüberhinaus häufig eine Einordnung der Fälle der Kategorie Unklares/Besonderes in eine der beiden Kategorien AT-negativ bzw. AT-positiv (vgl. z.B. Fall 15).



**Abb. 3.3** Dreiparametrische Auftragung des Prozentsatzes nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen Strahlensensitivität (G2/GF) und AFP-Wert. AFP-Werte >500 ng/ml wurden unter der Rubrik „500+“ eingetragen.

Umgekehrt ist aufgrund der Zellzyklusanalyse auch bei Fällen mit hohem AFP eine Zuordnung zur Gruppe „AT-negativ“ möglich, falls entsprechende niedrige Werte für Strahlensensitivität (G2/GF) und Zellproliferation gefunden werden. Besonderes augenfällig wird dies z.B. bei der Untersuchung von Nabelschnurblut Neugeborener, bei denen physiologischerweise erhöhte AFP-Werte beobachtet werden (>400 ng/ml, teilweise wurden Werte >10000 ng/ml erreicht).

### 3.4 Altersverteilung

Die Altersverteilung der untersuchten Fälle ist in Abb. 3.4 dargestellt. Der älteste Patient befand sich im 36. Lebensjahr, bei den jüngsten Patienten handelte es sich um pränatale Diagnosen aus Nabelschnurblut. 76% der an AT Erkrankten waren jünger als 10 Jahre, älter als 25 Jahre waren lediglich 3 Patienten (4%). Es handelt sich hier offenbar um milder verlaufende AT-Formen mit einer erhöhten Lebenserwartung; mit diesen AT-Varianten werden in der Literatur z.T. bestimmte ATM-Mutationen in Verbindung gebracht [McConville et al. 1996]. Das mittlere Alter der an AT Erkrankten betrug bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv 8.46 Jahre (Standardabweichung: 6.60 Jahre), bei den AT-negativen Kontrollen 9.21 Jahre (Standardabweichung: 11.27 Jahre).

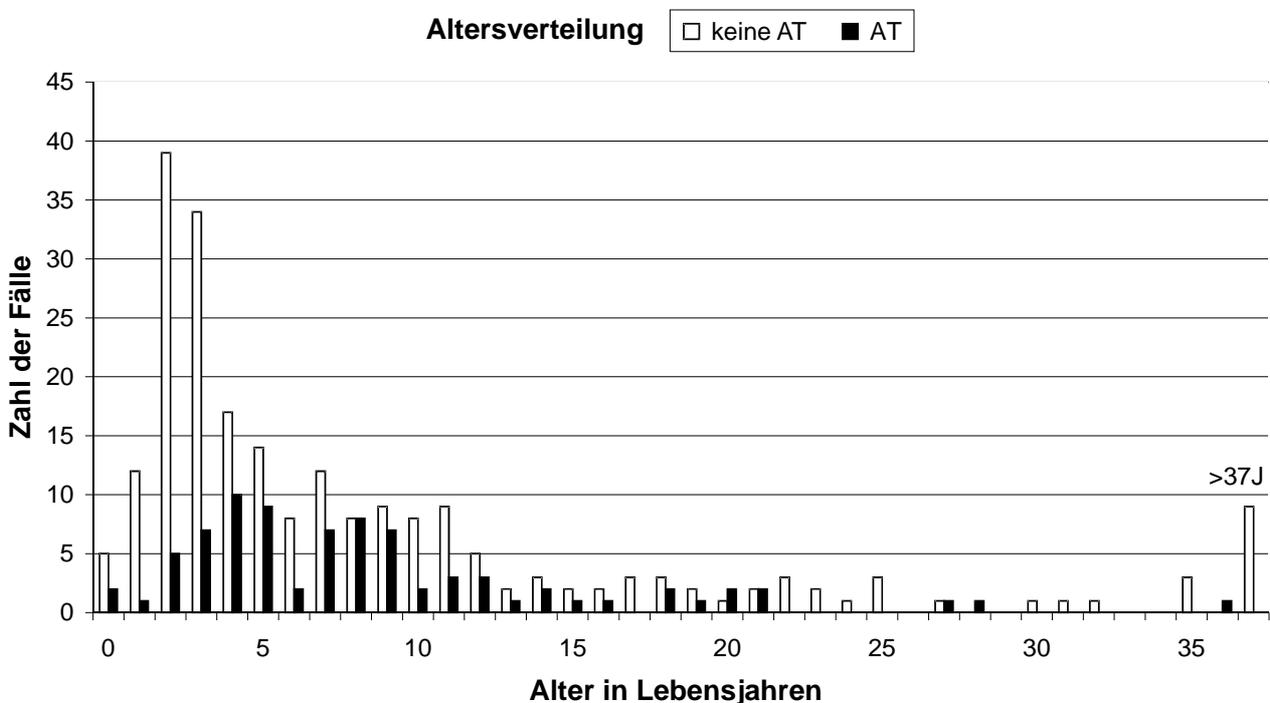
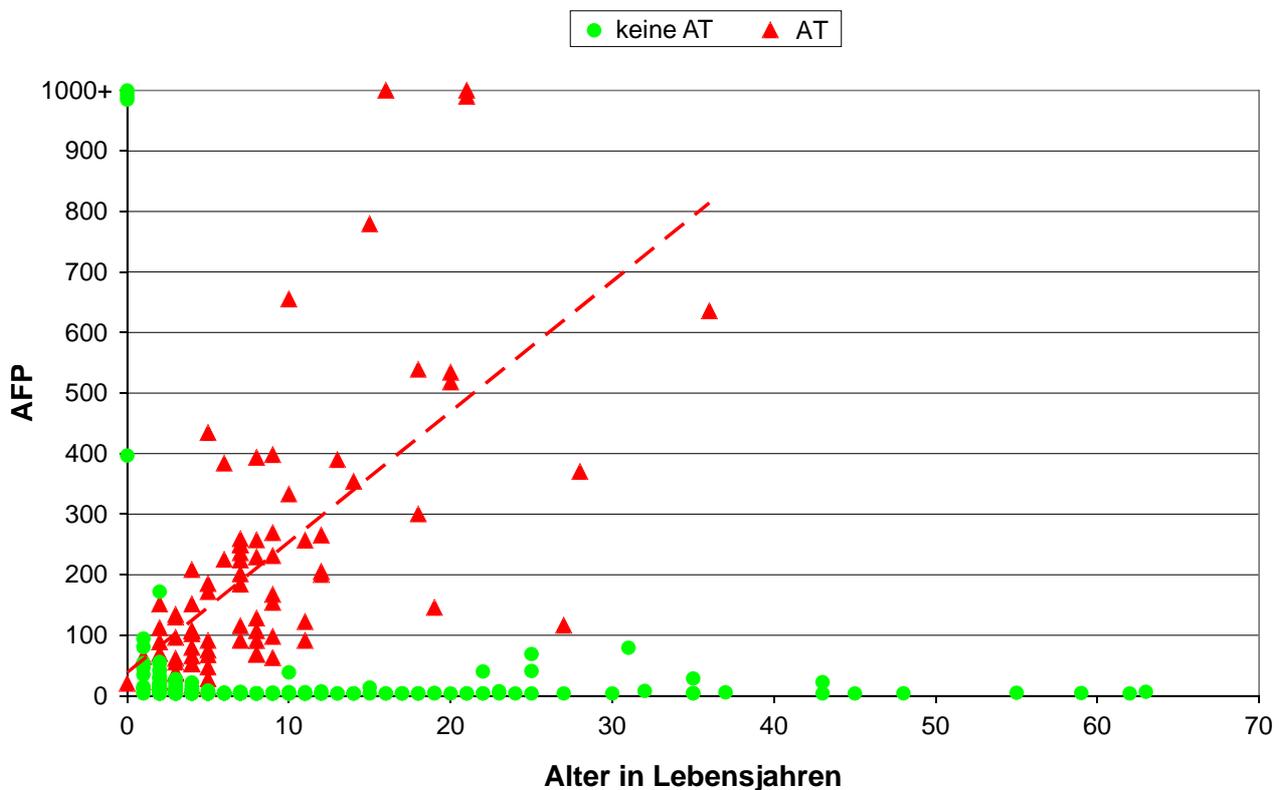


Abb. 3.4 Altersverteilung der untersuchten Fälle.

### 3.5 AFP-Werte als Funktion des Lebensalters

Ein Charakteristikum der Erkrankung AT ist, wie bereits erwähnt, der erhöhte AFP-Wert. Der innerhalb der Gruppe der AT-Fälle höchste gemessene AFP-Wert betrug 48219 ng/ml bei einer 19-jährigen Patientin, der niedrigste Wert 11.8 ng/ml bei einer 4-jährigen Patientin. Die Altersverteilung der AFP-Werte innerhalb der untersuchten Fälle ist in Abb. 3.5 dargestellt. Es besteht bei den hier untersuchten AT-Patienten offenbar eine Tendenz zu höheren AFP-Werten mit zunehmendem Lebensalter. Diese Tendenz wurde in anderen Untersuchungen nicht beobachtet [Woods et al. 1992]. Umgekehrt zeigt sich bei den AT-negativen Fällen mit dem Alter eher eine Abnahme des AFP-Wertes, was auf der allmählichen Angleichung der bei Neugeborenen physiologischerweise z.T. extrem hohen AFP-Werte im Laufe der ersten Lebensmonate und -jahre an die Normalwerte des Erwachsenenalters beruht [Normalwerte für AFP: Blohm et al. 1998; Ball et al. 1992]. Differentialdiagnostisch sind bei erhöhten AFP-Werten v.a. Lebererkrankungen (z.B. Hepatitis, hepatozelluläres Carcinom) sowie weitere Tumorerkrankungen abzuklären, sehr selten sind Fälle familiärer Hyper-AFPämie [Greenberg et al. 1990].



**Abb. 3.5** Korrelation des AFP-Wertes mit dem Lebensalter. AFP-Werte >1000 ng/ml wurden unter der Rubrik „1000+“ eingetragen.

### 3.6 Falldarstellungen

#### Gruppe I: AT-negative Kontrollen

Fall 1 [F-97-43-0]

Es handelt sich um eine 16-jährige Patientin mit armbetonter Ataxie beidseits, linksseitiger Hemiparese und Dysarthrie. Der AFP-Wert betrug 2.7 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine gute Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 12.4% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. Dieser Wert stieg bei Bestrahlung auf 18% (1.5 Gy), 27.4% (2.5 Gy) und 30.9% (4.0 Gy) an. 37.5% der unbestrahlten und 31.2% (1.5 Gy), 23.8% (2.5 Gy) bzw. 13.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.059 (1.5 Gy), 0.101 (2.5 Gy) bzw. 0.195 (4.0 Gy). Diese Werte liegen im Normalbereich, es liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor.

In Abb. I/1a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt. Abb. I/1b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

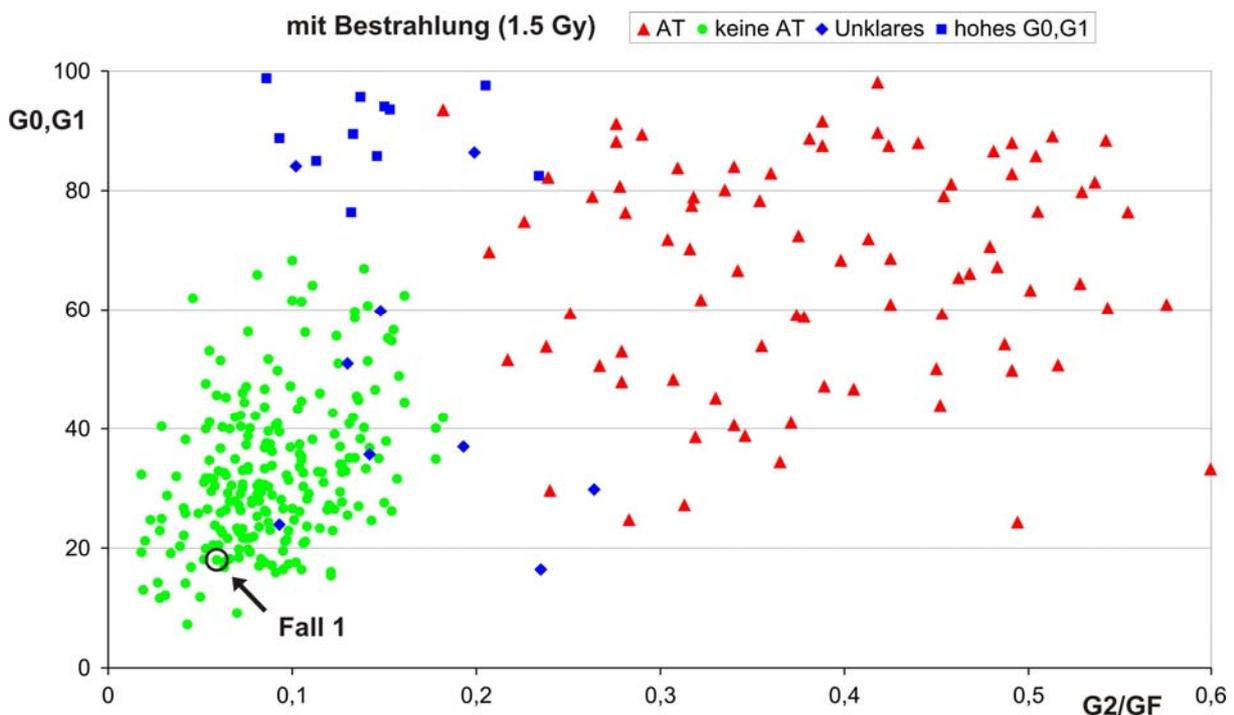


Abb. I/1a Fall 1: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

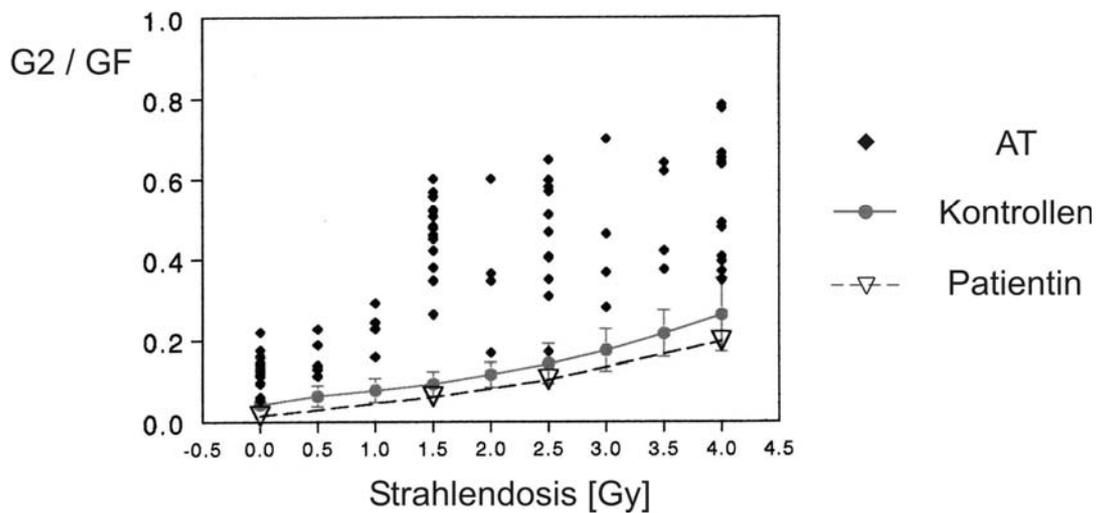
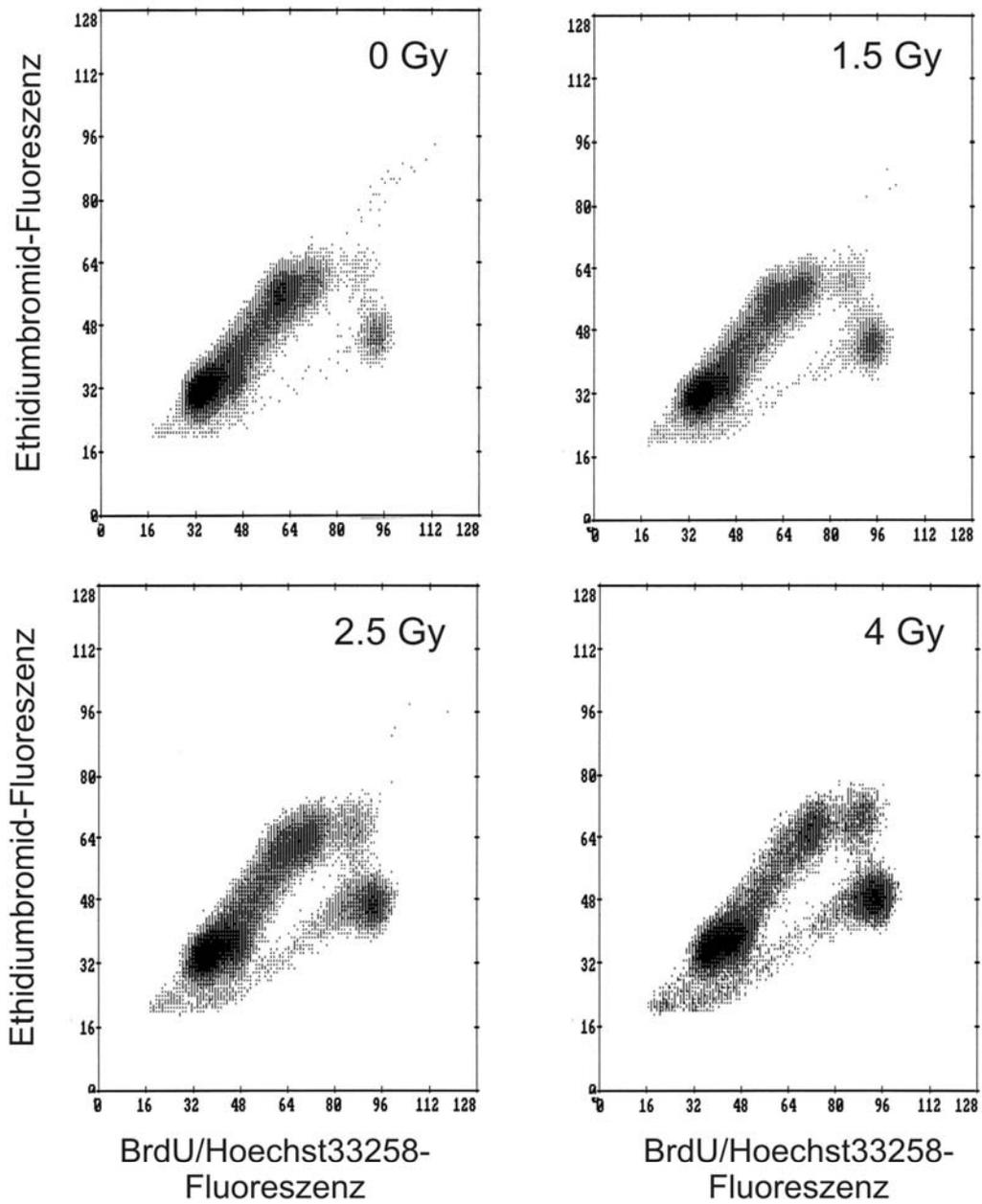
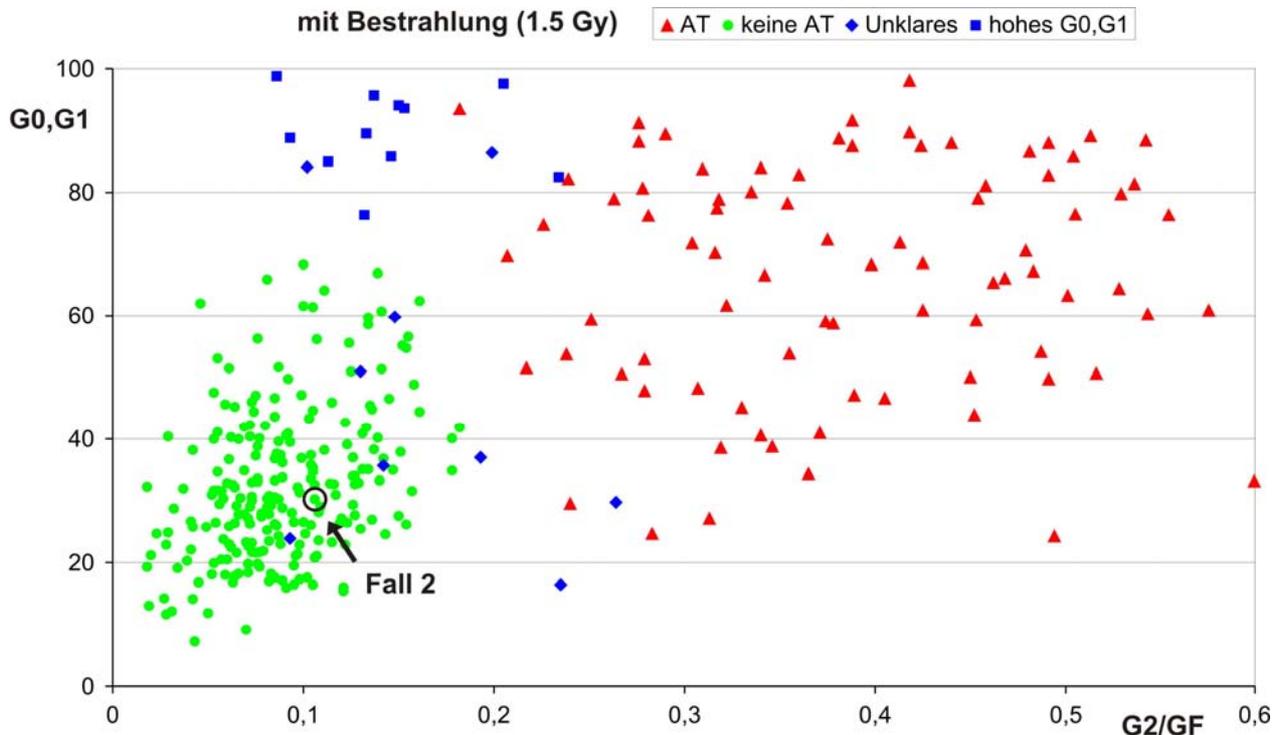


Abb. 1/1b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## Fall 2 [F-98-57-0]

Es handelt sich um einen 2-jährigen Jungen, dessen Bruder an AT erkrankt ist. Der AFP-Wert betrug 6.1 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten des Probanden zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine leicht unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 37.8% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert stieg bei Bestrahlung auf 30.3% (1.5 Gy), 34.8% (2.5 Gy) und 37.2% (4.0 Gy) an. 20.1% der unbestrahlten und 18.7% (1.5 Gy), 16.8% (2.5 Gy) bzw. 7.7% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.106 (1.5 Gy), 0.148 (2.5 Gy) bzw. 0.291 (4.0 Gy). Diese Werte liegen im Normalbereich, es liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor.

In Abb. I/2a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt. Abb. I/2b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.



**Abb. I/2a** Fall 2: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

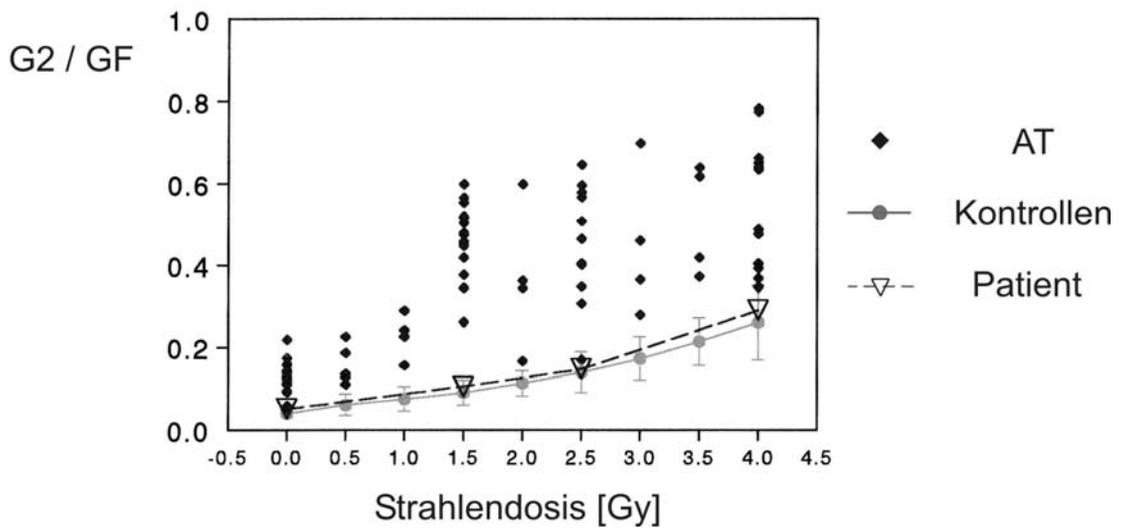
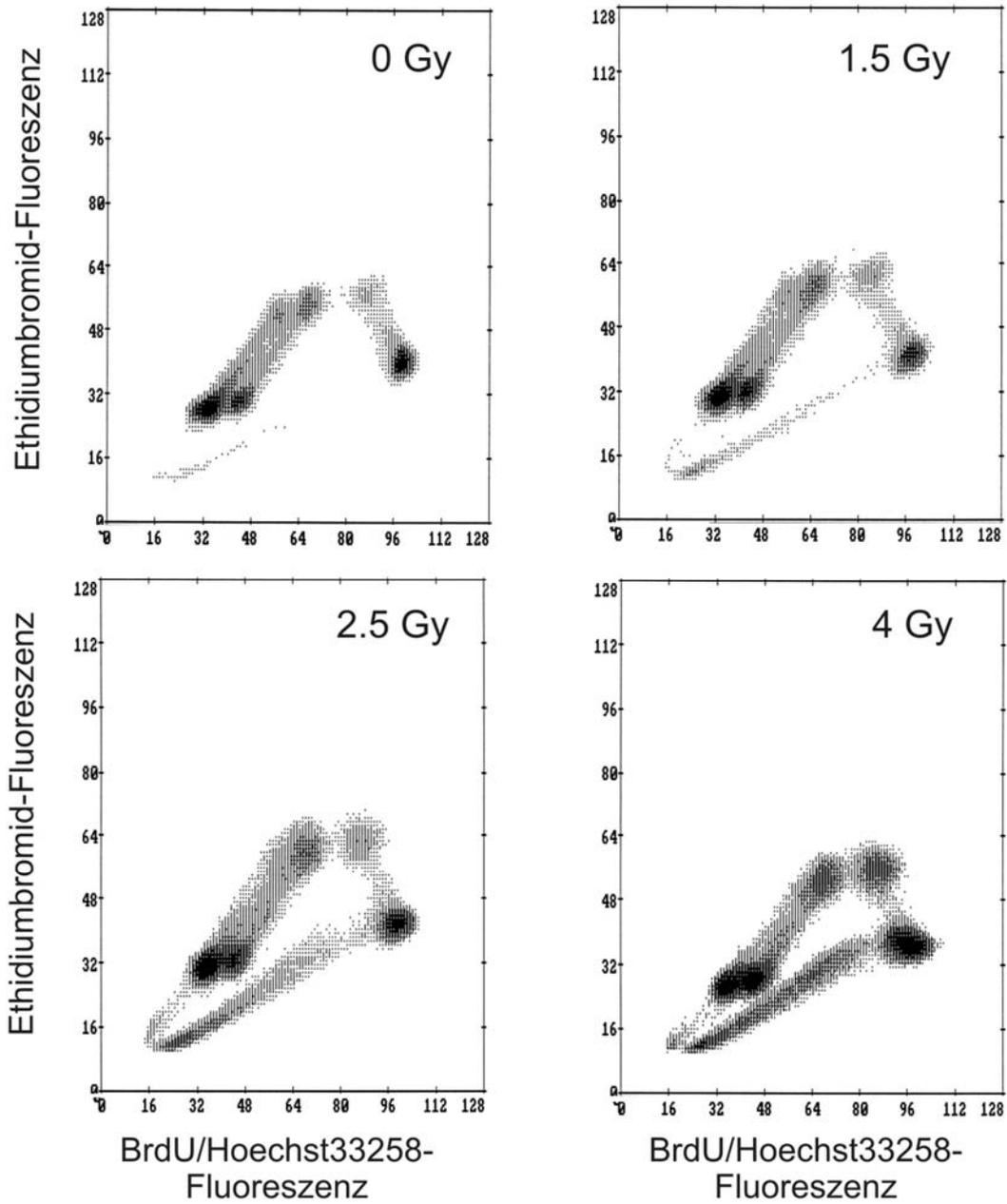


Abb. I/2b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

### Fall 3 [G-01-490]

Es handelt sich um einen 2-jährigen Patienten mit statomotorischer Retardierung, tetraspastischer Bewegungsstörung, Ataxie, Gefäßvermehrung konjunktival, Erniedrigung des Serum IgA-Wertes. Der AFP-Wert betrug 15.1 ng/ml und liegt damit noch im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine durchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 26.7% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert stieg bei Bestrahlung auf 31.0% (0.5 Gy) und 32.2% (1.5 Gy) an. 35.3% der unbestrahlten und 31.2% (0.5 Gy) bzw. 31.8% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.045 (0.5 Gy) bzw. 0.064 (1.5 Gy). Diese Werte liegen im Normalbereich, es liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor.

In Abb. I/3a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt. Abb. I/3b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

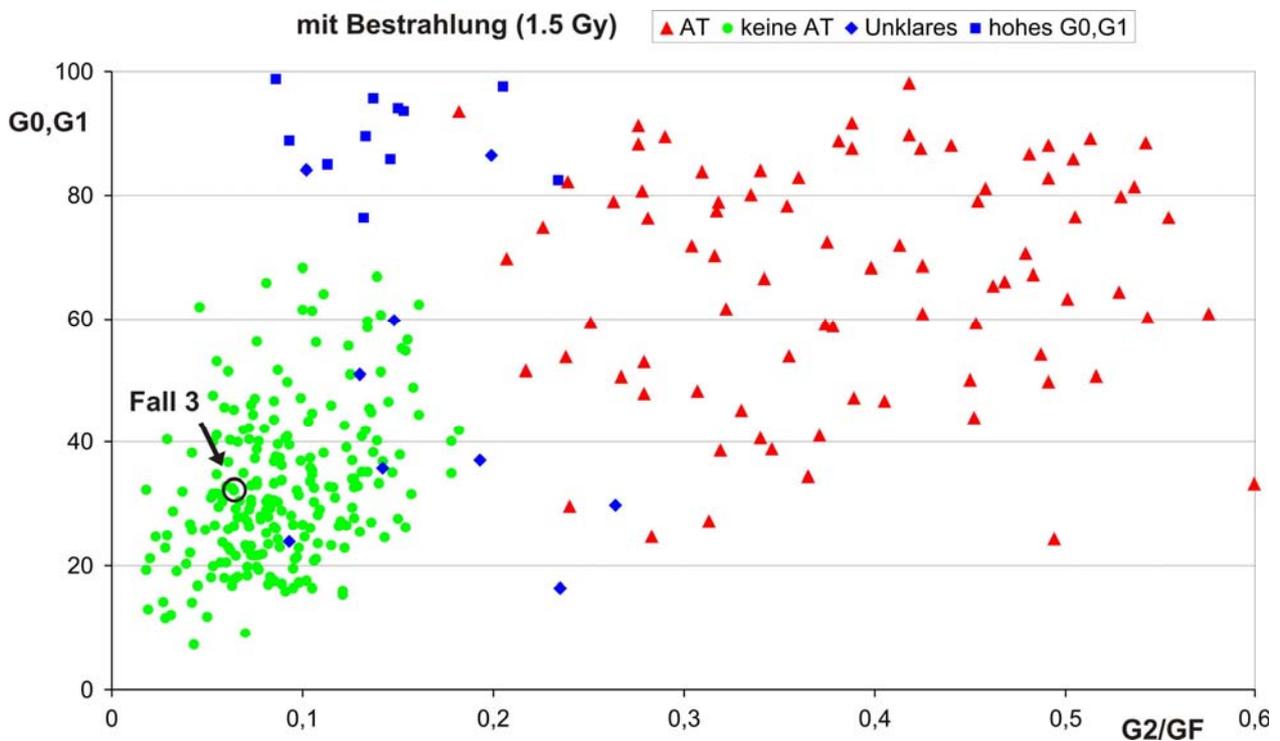


Abb. I/3a Fall 3: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

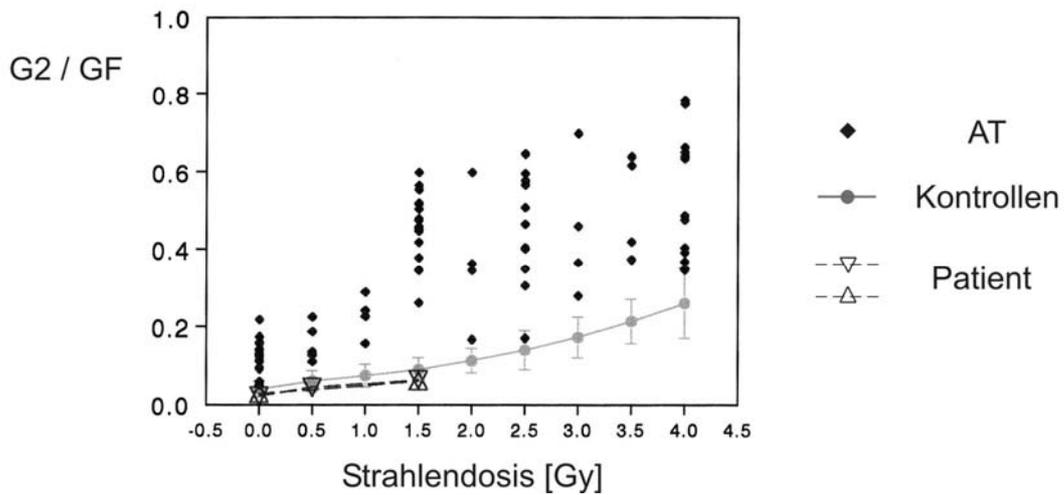
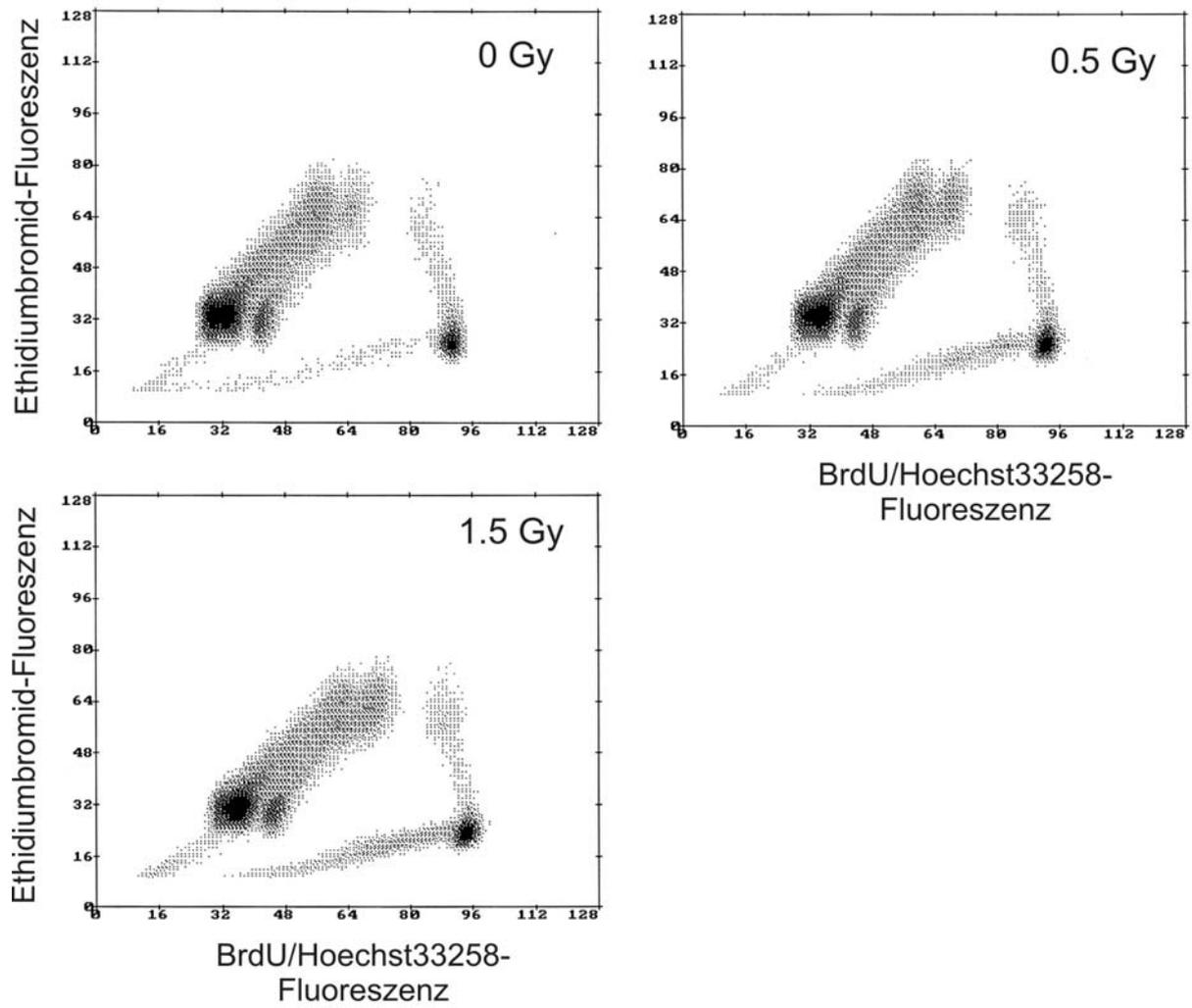
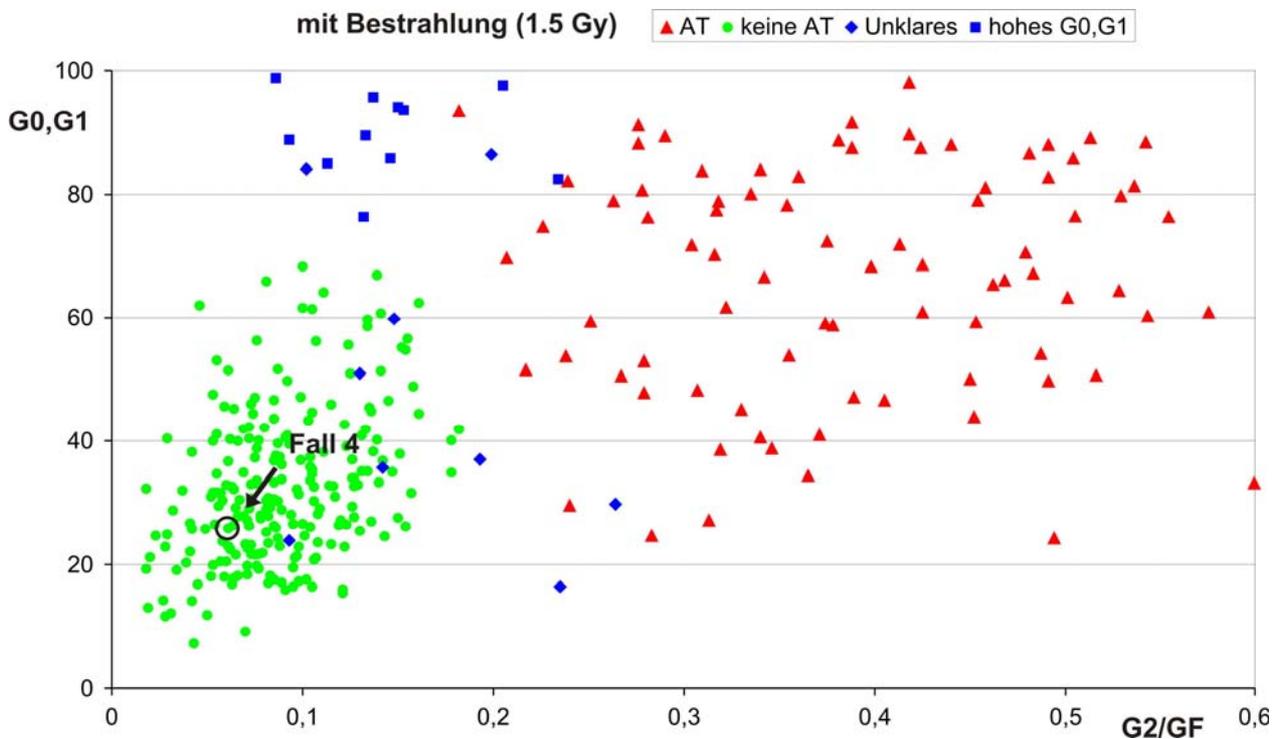


Abb. 1/3b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

#### Fall 4 [G-02-1954]

Es handelt sich um ein männliches Neugeborenes, das ein an Louis-Bar-Syndrom erkranktes Geschwister hat. Der AFP-Wert betrug 43923 ng/ml. Diese extrem hohen AFP-Werten sind jedoch bei Neugeborenen noch physiologisch. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine normale Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 22.9% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert stieg bei Bestrahlung auf 23.9% (0.5 Gy) und 25.9% (1.5 Gy) an. 38.0% der unbestrahlten und 38.7% (0.5 Gy) bzw. 28.8% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.023 (0.5 Gy) bzw. 0.061 (1.5 Gy). Diese Werte liegen im Normalbereich, es liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor.

In Abb. I/4a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt. Abb. I/4b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.



**Abb. I/4a** Fall 4: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

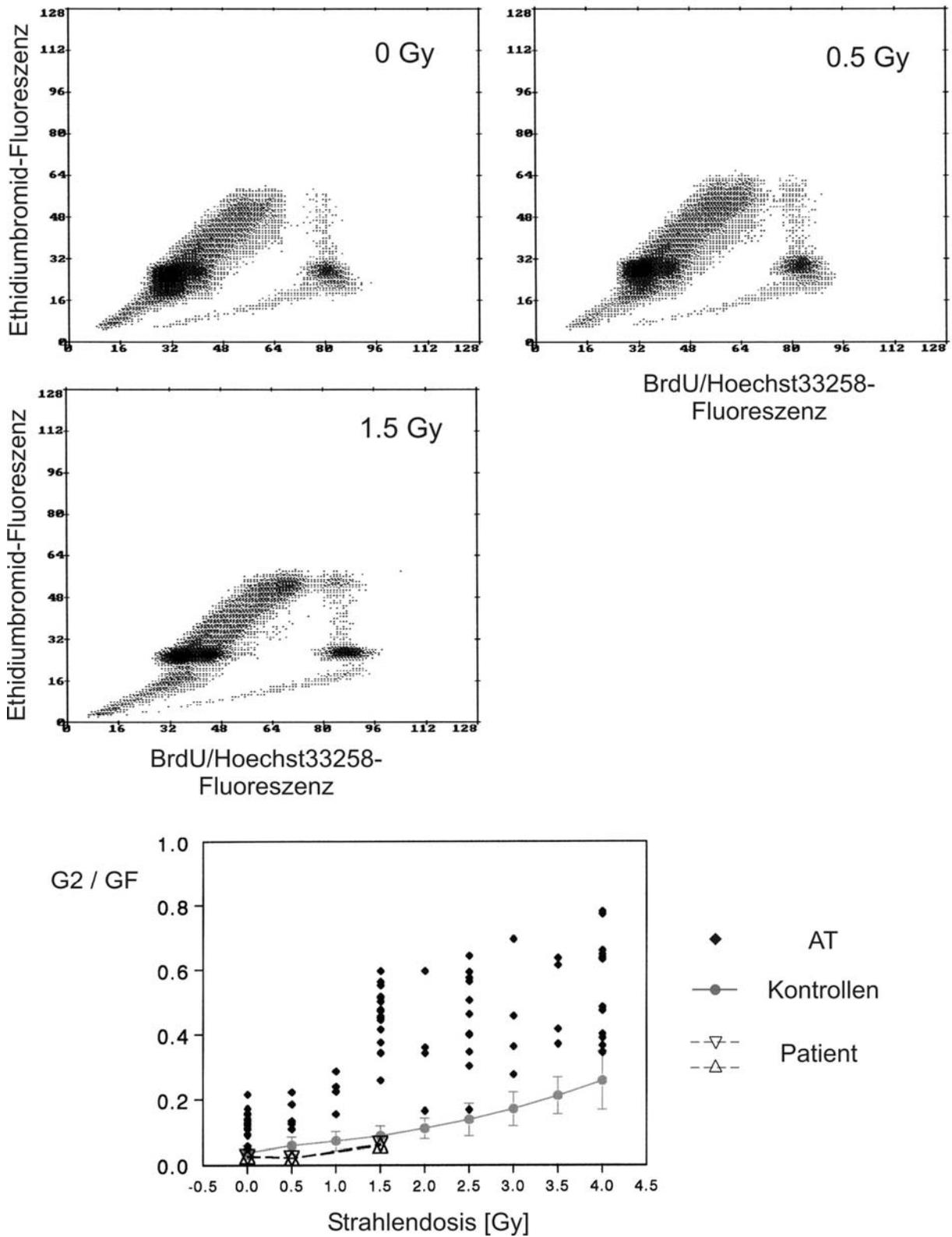


Abb. I/4b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## Gruppe II: AT-positive Fälle

Fall 5 [F-96-30-0]

Es handelt sich um einen 6-jährigen Patienten mit Ataxie, konjunktivalen Teleangiektasien und IgG-Mangel. Der AFP-Wert betrug 171.7 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 94.8% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert veränderte sich bei Bestrahlung nur wenig: 93.5% (1.5 Gy), 94.9% (2.5 Gy) und 94.3% (4.0 Gy). Nur 0.4% der unbestrahlten und 0.3% (1.5 Gy), 0.0% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.182 (1.5 Gy), 0.117 (2.5 Gy) bzw. 0.297 (4.0 Gy). Diese Werte liegen im Grenzbereich zu erhöhter Strahlensensitivität. Zusammen mit dem beobachteten unterdurchschnittlichen Zellwachstum und dem erhöhten AFP-Wert steht dieser Befund insgesamt im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Diese Verdachtsdiagnose wurde durch Mutationsanalyse des ATM-Gens bestätigt. Der Patient erwies sich als homozygot für die Veränderung 4909+1g→a. Hierbei handelt es sich um eine Mutation, die zu aberrantem Spleißen und Fehlen der Sequenz von Exon 34 in der cDNA führt.

In Abb. II/5a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

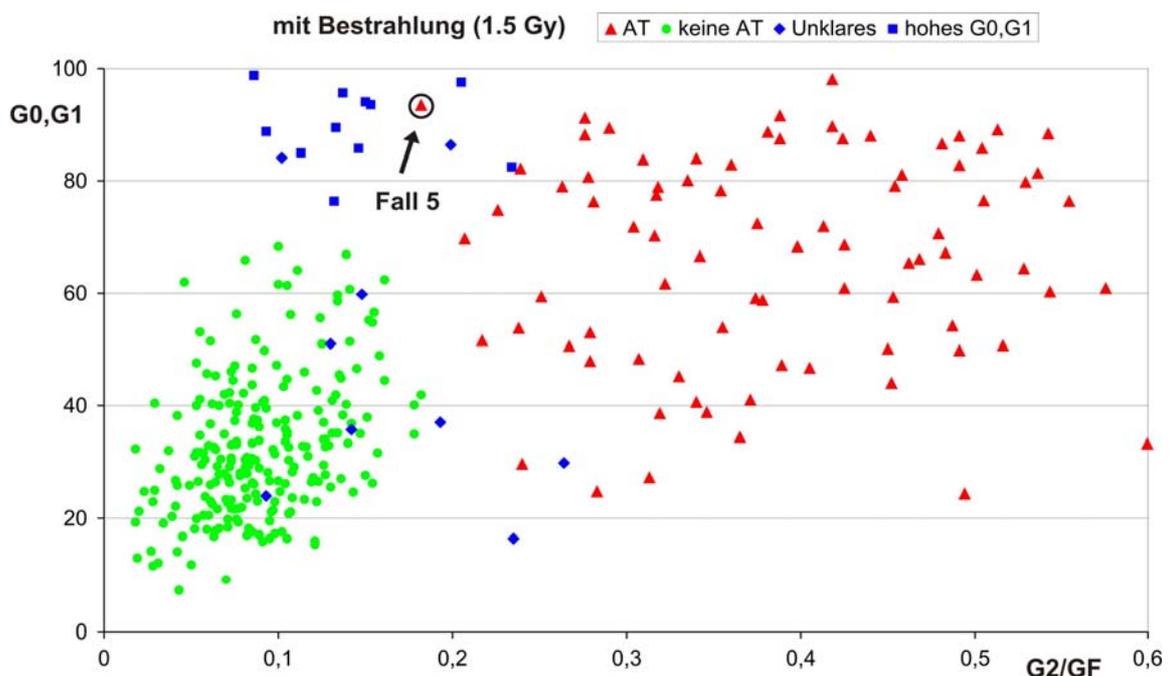


Abb. II/5a Fall 5: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/5b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

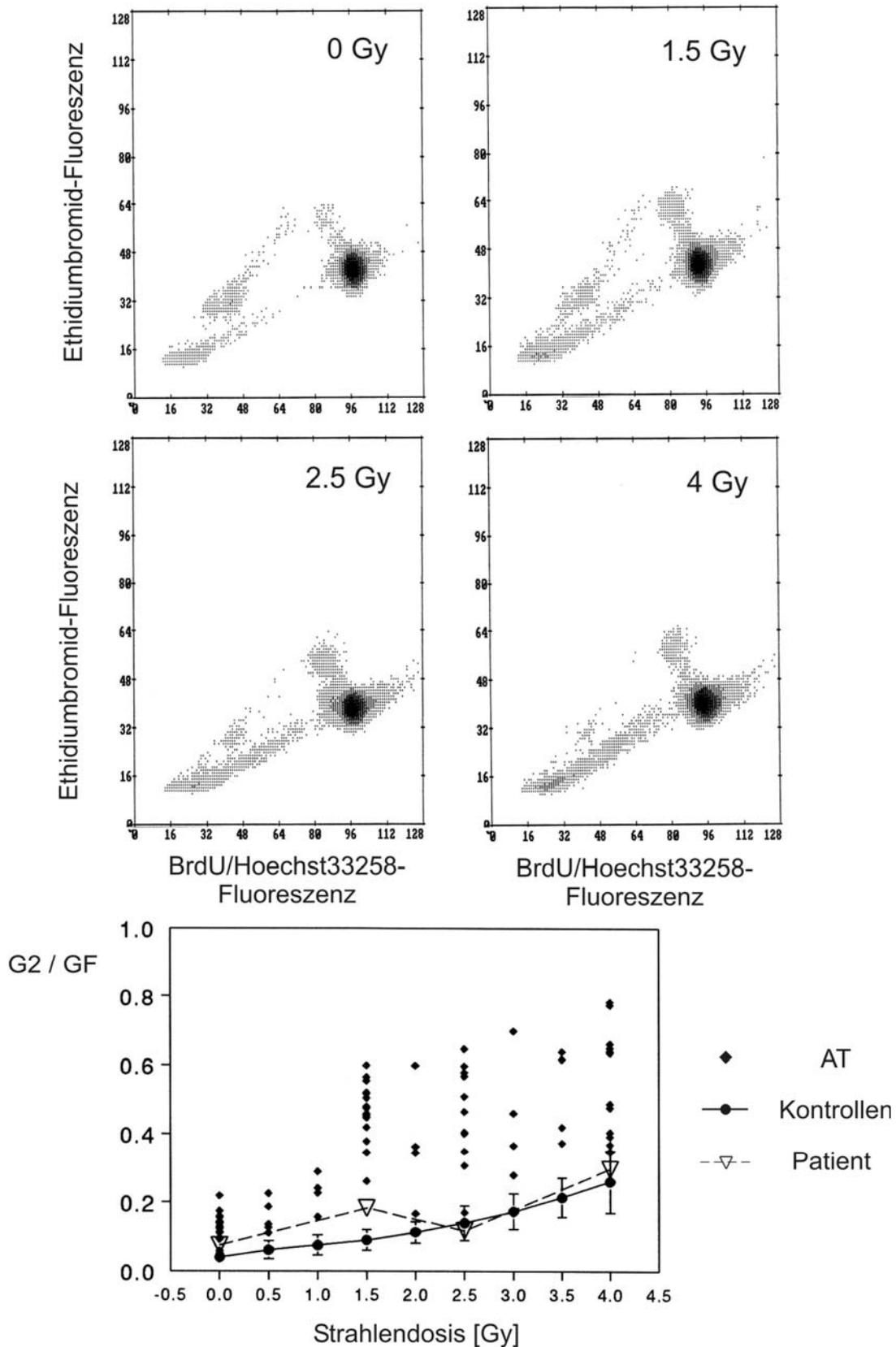


Abb. II/5b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 6: [F-94-46-0]

Es handelt sich um eine 4-jährige Patientin mit Ataxie und konjunktivalen Teleangiektasien. Der AFP-Wert betrug 75.0 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 51.1% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 60.9% (1.5 Gy), 59.1% (2.5 Gy) und 64.7% (4.0 Gy). 6.2% der unbestrahlten und 0.9% (1.5 Gy), 0.1% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.575 (1.5 Gy), 0.533 (2.5 Gy) bzw. 0.659 (4.0 Gy). Diese Werte liegen weit außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und die beobachtete Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) stehen wie der erhöhte AFP-Wert im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Diese Verdachtsdiagnose wurde durch Mutationsanalyse des ATM-Gens bestätigt. Die Patientin erwies sich als homozygot für die Veränderung 7668del4. Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 4 Basenpaaren im Exon 54, die zu prämatuerm Abbruch (truncation) der Proteinsynthese führt.

In Abb. II/6a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

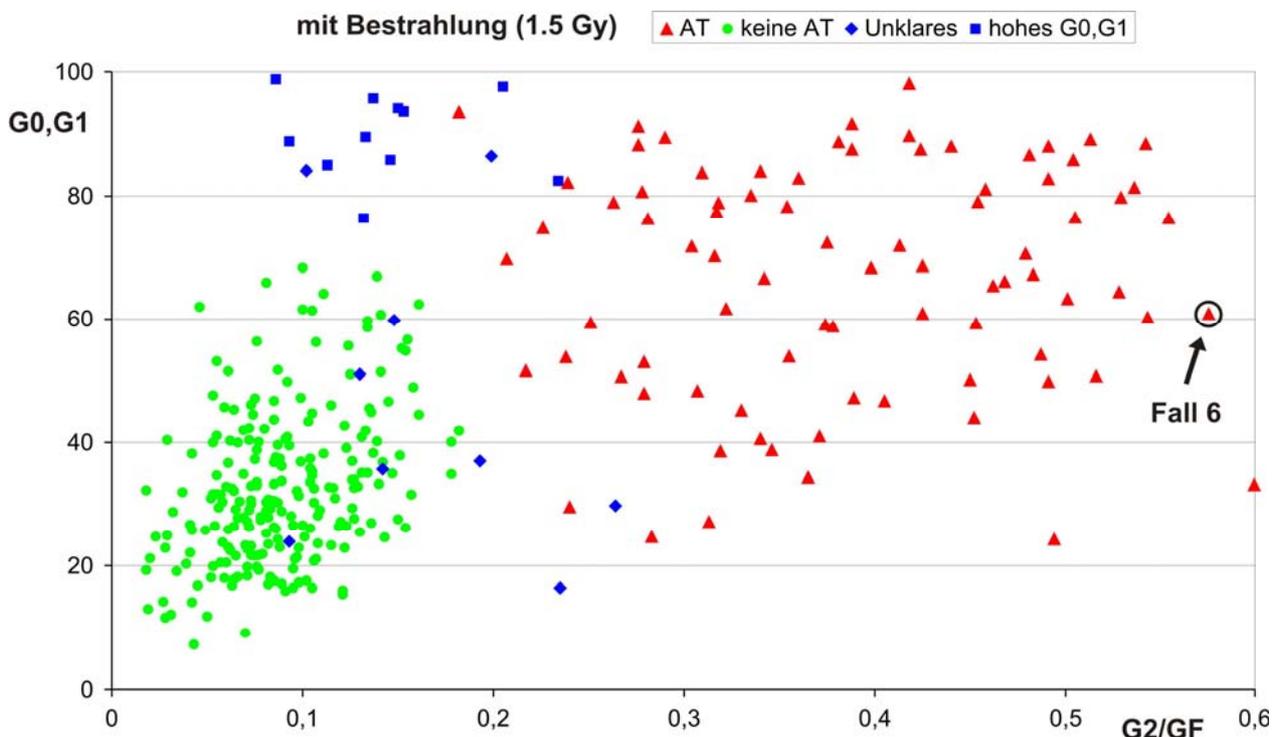


Abb. II/6a Fall 6: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. 3.12 zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

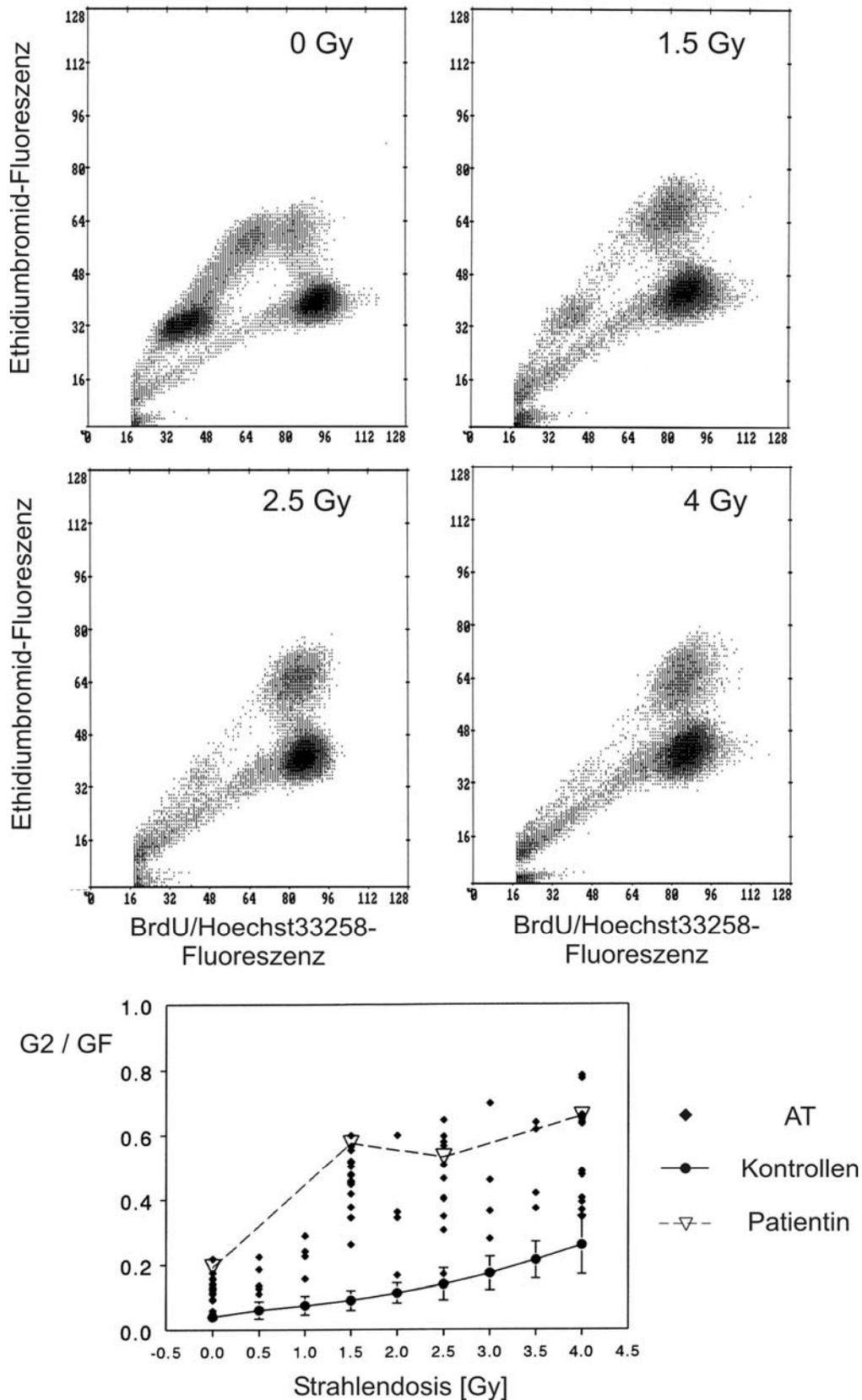


Abb. II/6b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 7 [G-02-2458]

Es handelt sich um eine 7-jährige Patientin mit Gangataxie, okulomotorischer Dyspraxie, okulären Teleangiectasien, Infektanfälligkeit. Der AFP-Wert betrug 183.9 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 50.1% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 47.8% (0.5 Gy) und 53.9% (1.5 Gy). 13.9% der unbestrahlten und 10.9% (0.5 Gy) bzw. 3.0% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.155 (0.5 Gy) bzw. 0.355 (1.5 Gy). Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und die beobachtete Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) stehen wie der erhöhte AFP-Wert im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Bei einer Mutationsanalyse des ATM-Gens fand sich die Mutation D2708E. Die Patientin erwies sich als homozygot für diese Veränderung, die zu einer Aminosäuresubstitution in einem funktionell konservierten Bereich des ATM-Proteins führt.

In Abb. II/7a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

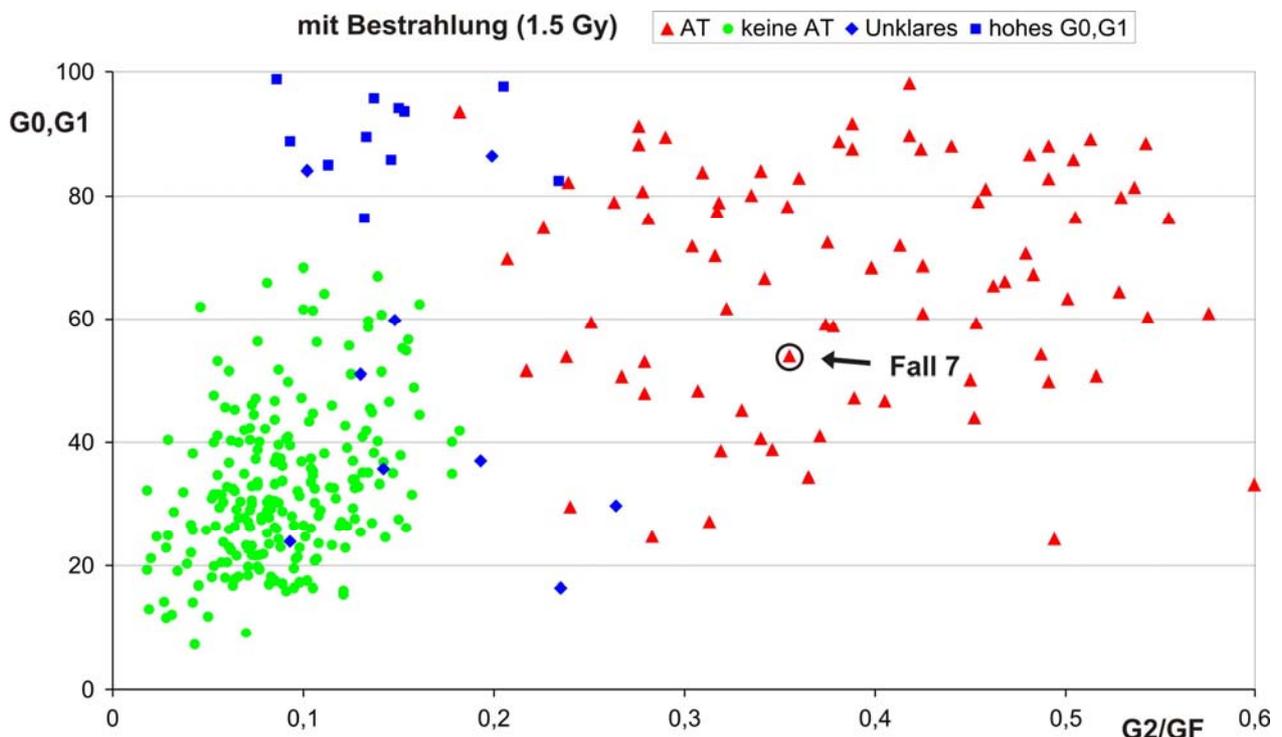


Abb. II/7a Fall 7: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/7b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

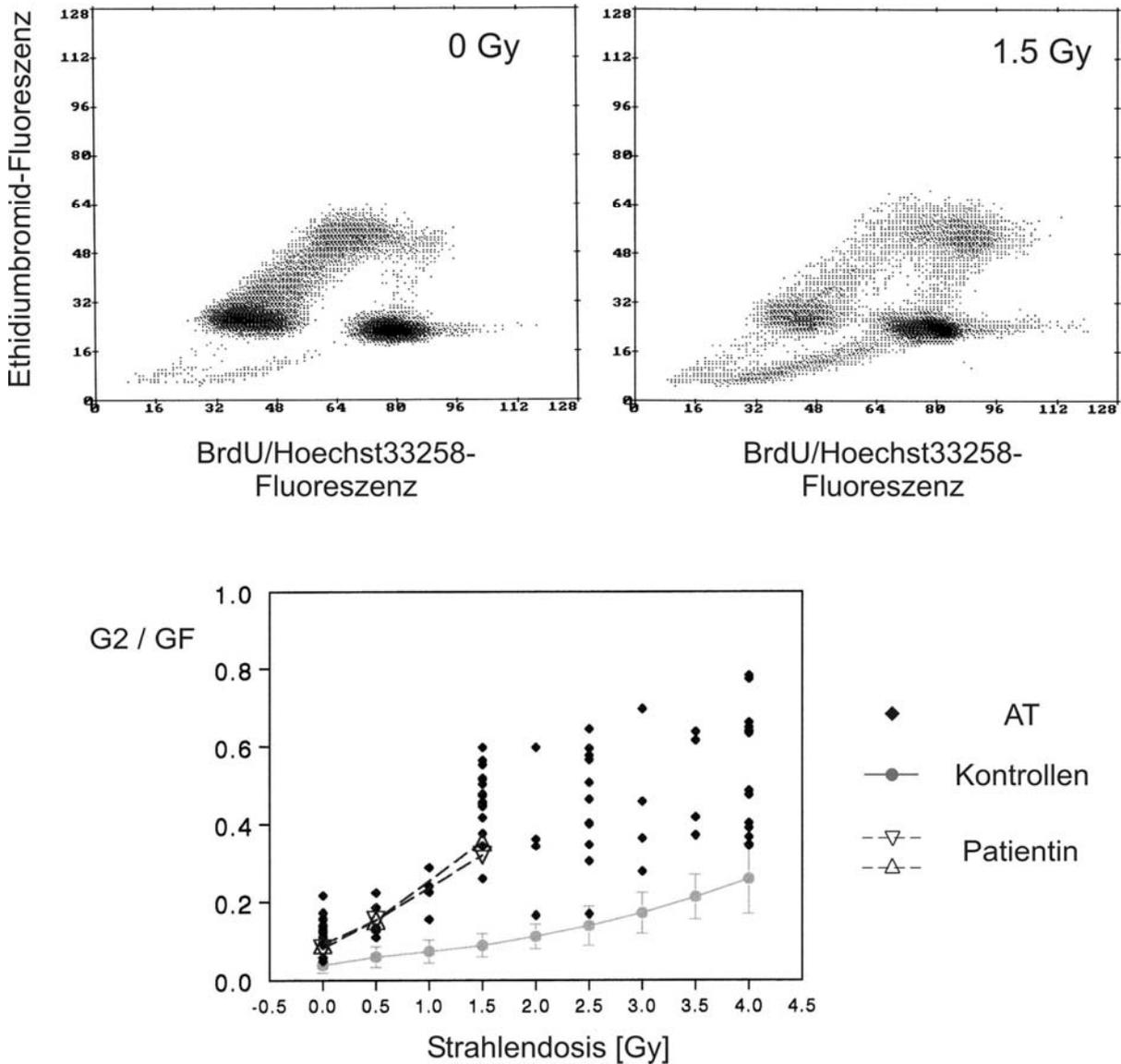


Abb. II/7b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 8 [F-96-46-0/G-03-1467]

Es handelt sich um einen 2-jährigen Patienten mit Ataxie und Hypogammaglobulinämie (IgG und IgA vermindert). Der AFP-Wert betrug 61.4 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 77.6% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 74.8% (1.5 Gy), 78.6% (2.5 Gy) und 76.2% (4.0 Gy). Nur 2.5% der unbestrahlten und 1.3% (1.5 Gy), 0.5% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.226 (1.5 Gy), 0.473 (2.5 Gy) bzw. 0.394 (4.0 Gy). Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und die beobachtete Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) stehen wie der erhöhte AFP-Wert im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Diese Verdachtsdiagnose wurde durch Mutationsanalyse des ATM-Gens bestätigt. Der Patient erwies sich als homozygot für die Veränderung 26delT. Diese Deletion eines T an cDNA-Position 26-27 in Exon 4 führt zu einem prämaturnen Stopcodon. Der trunkierende Effekt der Mutation wurde im Protein-Truncation-Test auf RNA/cDNA-Ebene belegt.

In Abb. II/8a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

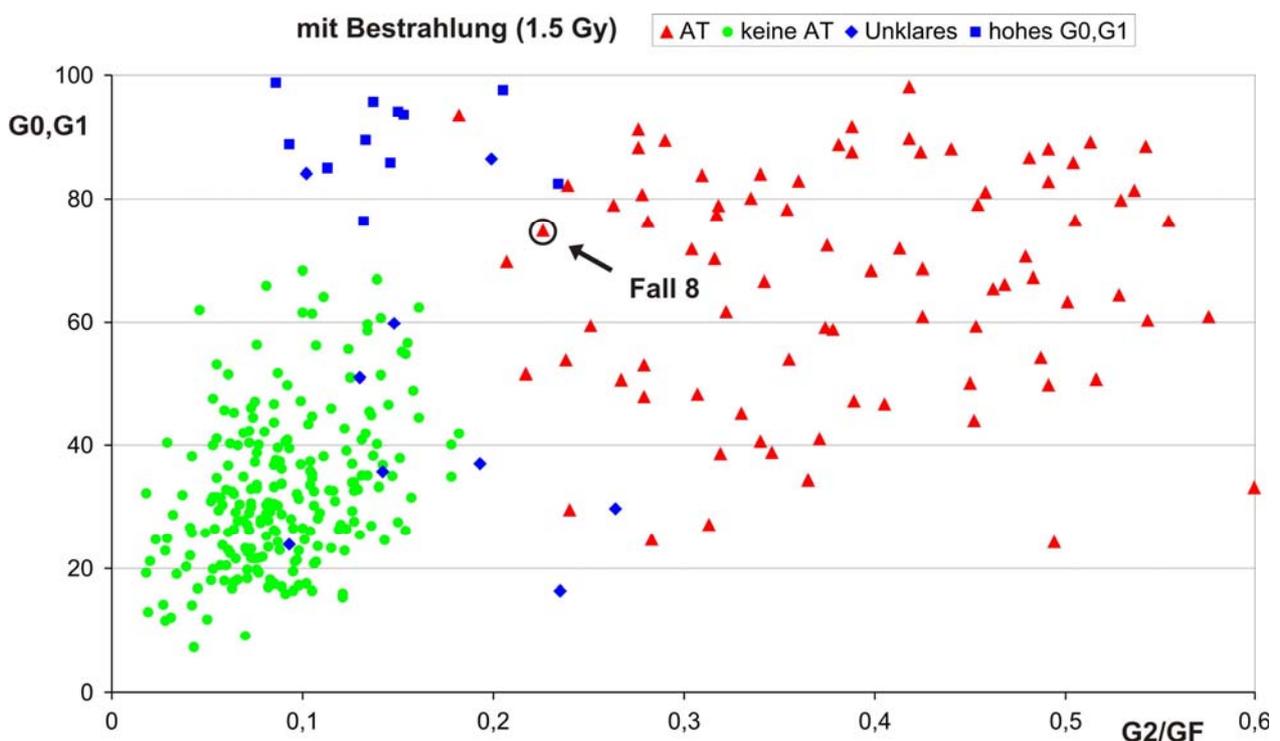


Abb. II/8a Fall 8: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/7b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

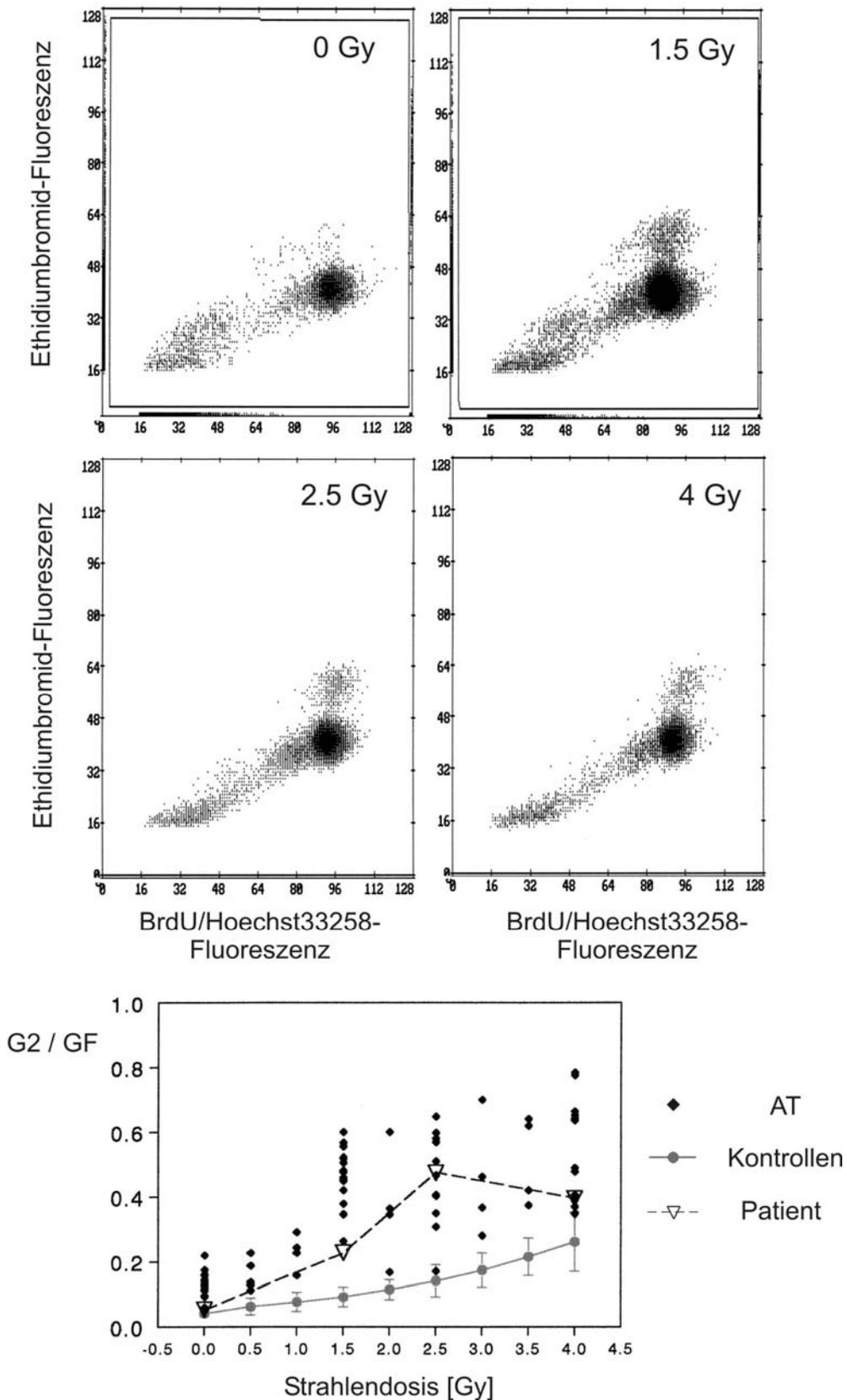


Abb. II/8b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 9 [F-99-20-0/F-99-20-1]

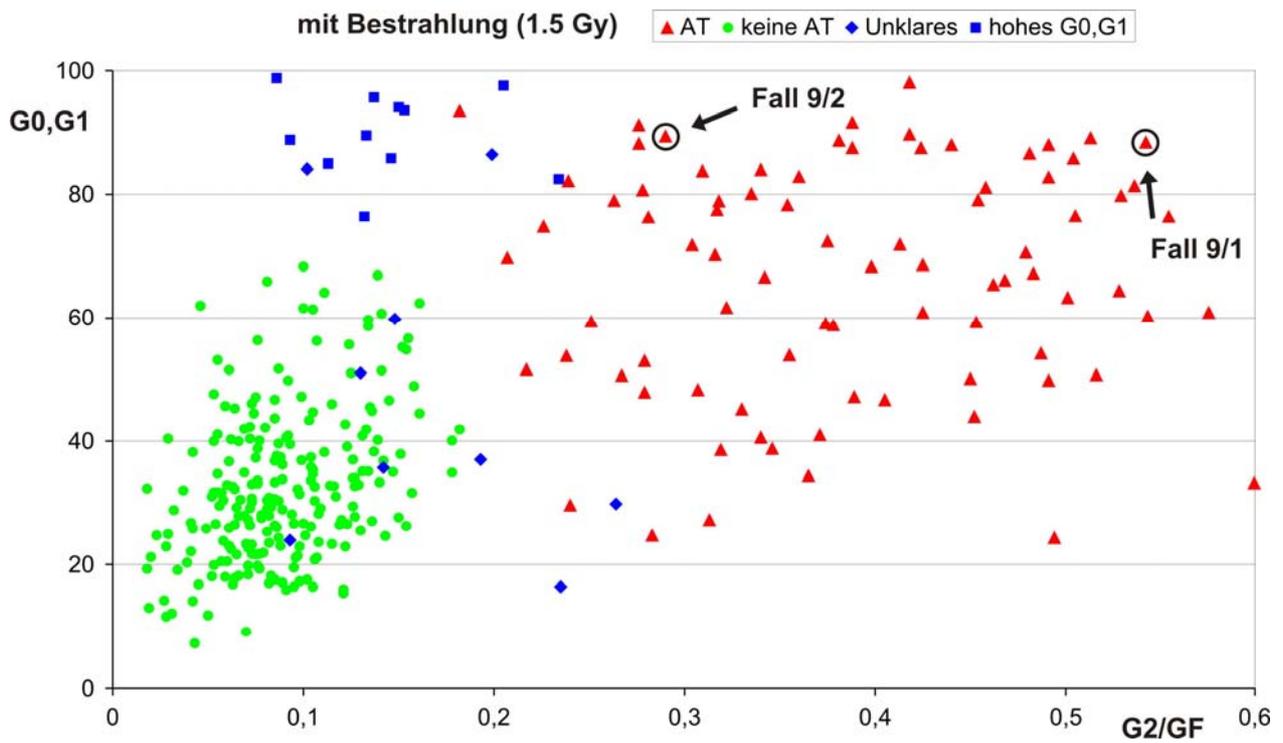
Es handelt sich um einen 6-jährigen Patienten mit Ataxie, konjunktivalen Teleangiektasien, Infektanfälligkeit, Z.n. Kleinhirnabszess, Hypogammaglobulinämie (IgA). Der AFP-Wert betrug 249.0 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Strahlensensitivität peripherer Blutzellen des Patienten wurde in zwei in Abständen von 13 Tagen durchgeführten Untersuchungen ermittelt.

Bei der 1. Untersuchung zeigten die Lymphozyten des Patienten, bezogen auf das Lebensalter, eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 87.4% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 88.4% (1.5 Gy). 1.7% der unbestrahlten und 0.3% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/GF) betrug 0.542 (1.5 Gy).

Bei der 2. Untersuchung zeigten die Lymphozyten des Patienten, bezogen auf das Lebensalter, wiederum eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 87.8% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 89.4% (1.5 Gy), 90.8% (2.5 Gy) und 92.4% (4.0 Gy). 1.1% der unbestrahlten und 0.1% (1.5 Gy), 0.0% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/GF) betrug 0.290 (1.5 Gy), 0.379 (2.5 Gy) bzw. 0.328 (4.0 Gy).

Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und die beobachtete Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/GF-Ratio nach Bestrahlung) stehen wie der erhöhte AFP-Wert im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Diese Verdachtsdiagnose wurde durch Mutationsanalyse des ATM-Gens bestätigt. Der Patient erwies sich als homozygot für die Veränderung 4988delGT. Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 2 Basenpaaren im Exon 35, die zu prämatuerm Abbruch (Truncation) der Proteinsynthese führt.

In Abb. II/9a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt. Abb. II/9b (1. Untersuchung) bzw. Abb. II/9c (2. Untersuchung) zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G<sub>2</sub>/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.



**Abb. II/9a** Fall 9: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle (Fall 9/1: 1. Untersuchung; Fall 9/2: 2. Untersuchung).

# 1. Untersuchung

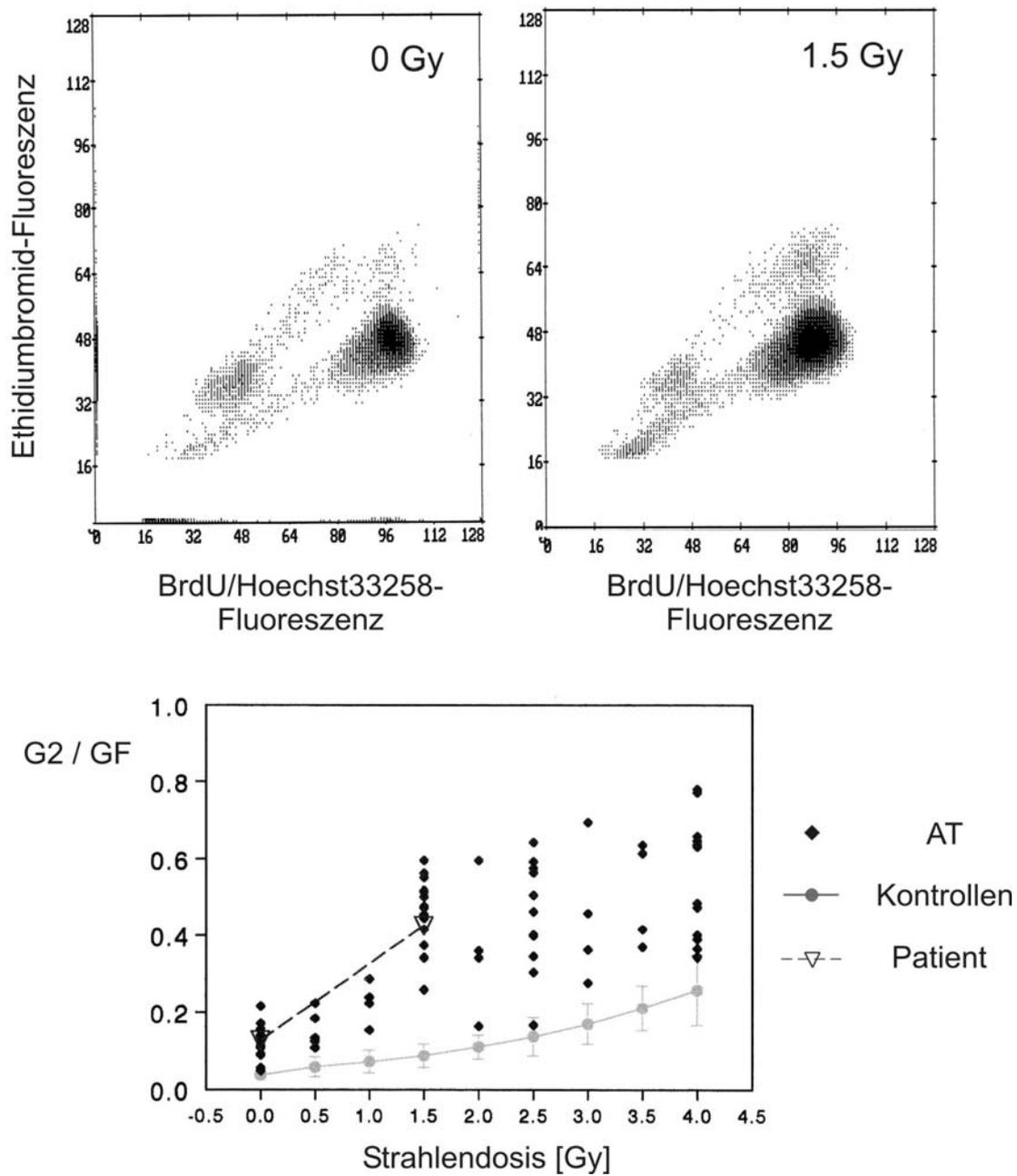


Abb. II/9b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## 2. Untersuchung

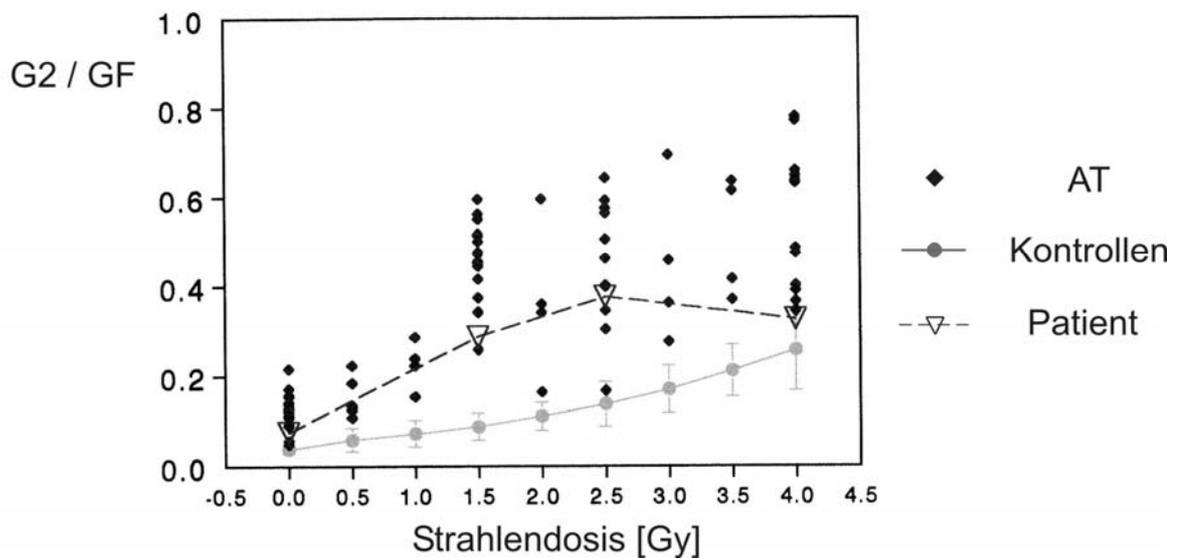
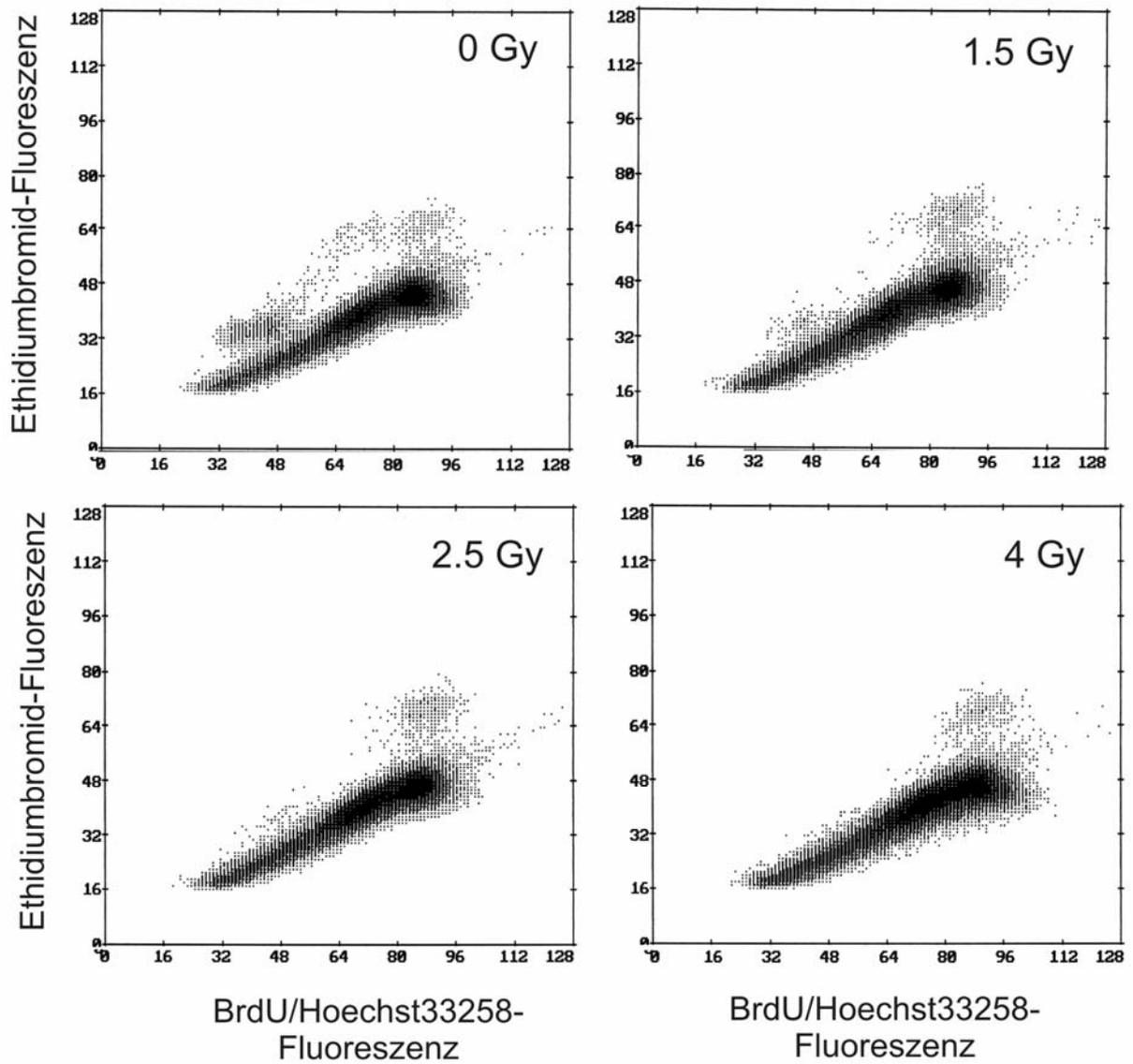
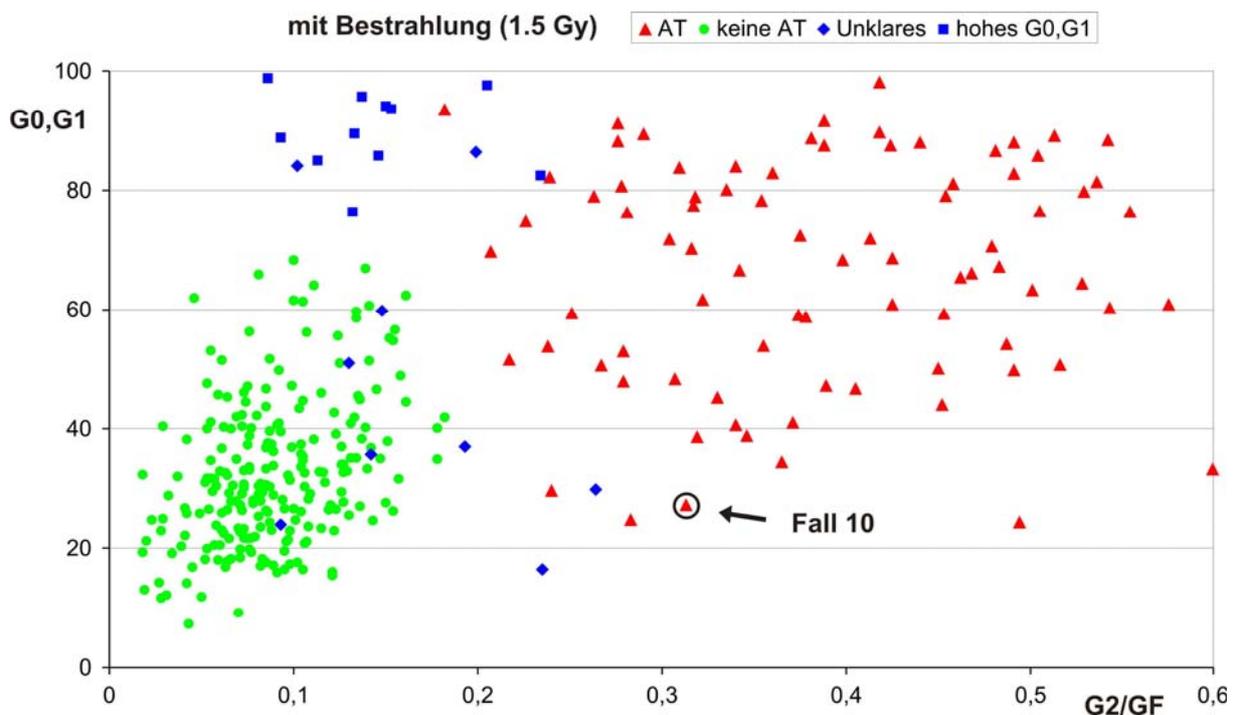


Abb. II/9c Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

### Fall 10 [F-95-68-0]

Es handelt sich um eine 4-jährige Patientin mit Choreoathetose, Dystonie, Hypogammaglobulinämie (IgG, IgE). Der AFP-Wert betrug 11.8 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe hinaus lediglich leicht erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine leicht verringerte Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 28.1% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei: 27.2% (1.5 Gy), 29.6% (2.5 Gy) und 23.0% (4.0 Gy). 26.7% der unbestrahlten und 12.7% (1.5 Gy), 3.6% (2.5 Gy) bzw. 0.8% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.313 (1.5 Gy), 0.632 (2.5 Gy) bzw. 0.762 (4.0 Gy). Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Das leicht unterdurchschnittliche Zellwachstum und der leicht erhöhte AFP-Wert stehen zusammen mit der beobachteten Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) insgesamt im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Bei einer Mutationsanalyse des ATM-Gens konnte eine Deletion von 159 Basenpaaren identifiziert werden, welche genau dem Exon 54 entspricht. Die Patientin erwies sich als heterozygot für diese Veränderung, eine weitere Mutation konnte bislang nicht identifiziert werden.

In Abb. II/10a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.



**Abb. II/10a** Fall 10: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/10b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

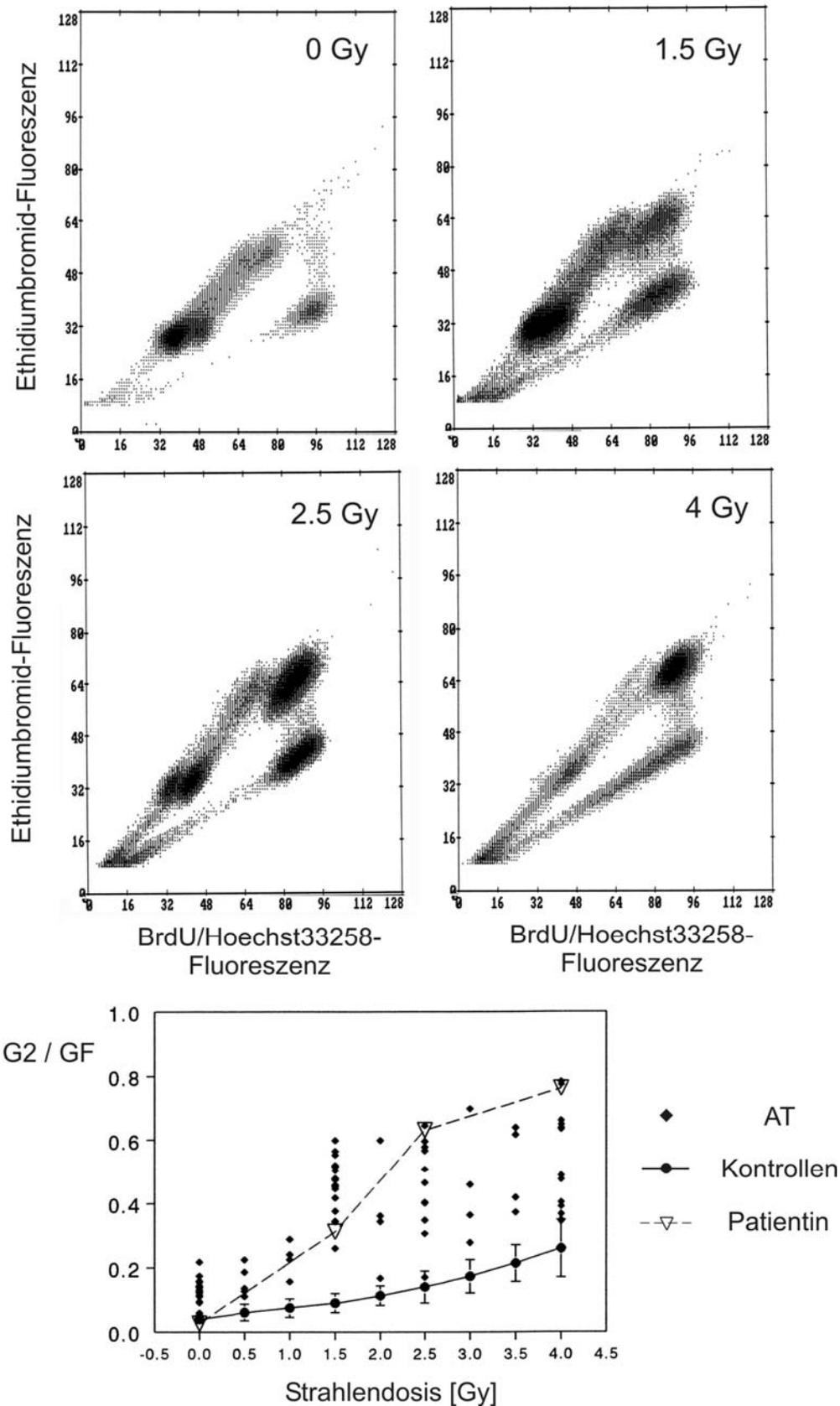


Abb. II/10b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 11 [G-02-2668/F-96-50]

Es handelt sich um einen 3-jährigen Patienten mit rezidivierenden Bronchopneumonien, Hypogammaglobulinämie (IgG, IgA) und motorischer Entwicklungsverzögerung mit leichter Ataxie. Der AFP-Wert betrug 52 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe hinaus erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 78.2% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 78.3% (1.5 Gy), 74.7% (2.5 Gy) und 23.2% (4.0 Gy). 1.4% der unbestrahlten und 0.4% (1.5 Gy), 0.3% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.354 (1.5 Gy), 0.486 (2.5 Gy) bzw. 0.378 (4.0 Gy). Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und der erhöhte AFP-Wert stehen zusammen mit der beobachteten Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) im Einklang mit der Verdachtdiagnose Ataxia telangiectasia. Bei einer Mutationsanalyse des ATM-Gens konnte eine Deletion von 18 Basenpaaren in Exon 7 identifiziert werden (491del18), welche zum Skipping von Exon 7 und damit zu einem um 55 Aminosäuren verkürzten ATM-Polypeptid führt. Der Patient erwies sich als heterozygot für diese Veränderung, eine weitere Mutation konnte bislang nicht identifiziert werden.

In Abb. II/11a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

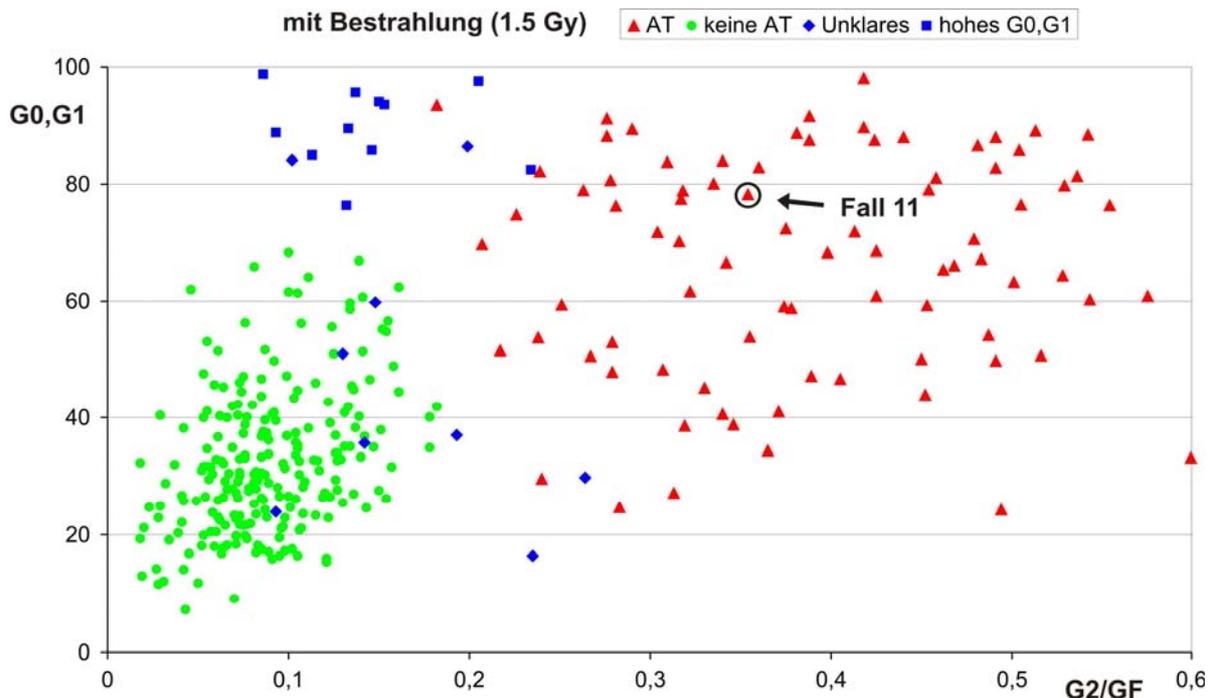


Abb. II/11a Fall 11: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/11b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

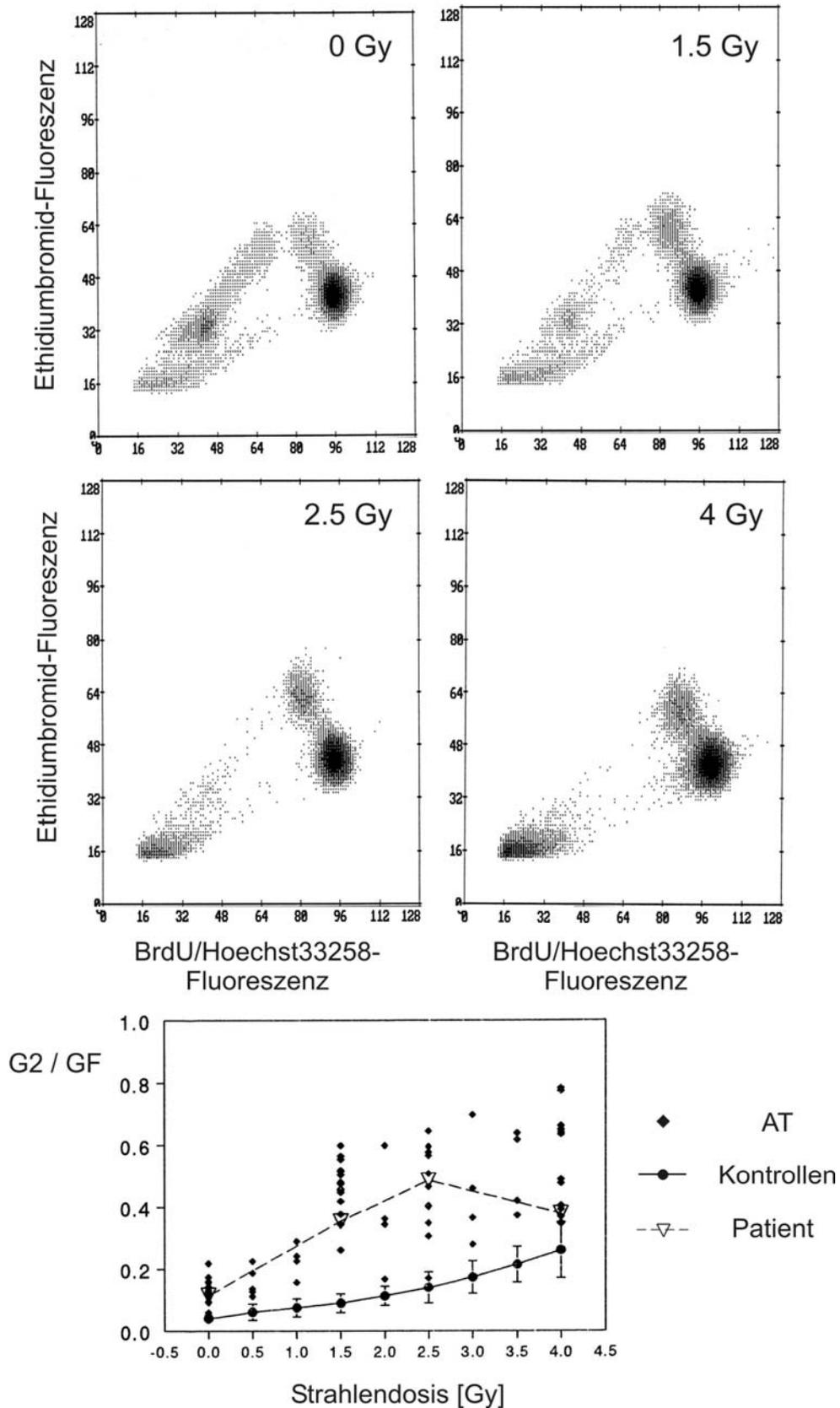


Abb. II/11b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## Fall 12 [G-01-306]

Es handelt sich um einen 6-jährigen Patienten mit cerebellärer Ataxie (NMR: Kleinhirnatrophie), Teleangiectasien (Augen, Ohr) und rezidivierenden Atemwegsinfektionen bei Dysgammaglobulinämie. Der AFP-Wert betrug 115.4 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe hinaus erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. 72 Stunden nach Kulturbeginn waren 49.9% der unbestrahlten und 51.6% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. 13.2% der unbestrahlten und 5.5% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.217 (1.5 Gy). Dieser Werte liegt außerhalb des Normalbereiches. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und der erhöhte AFP-Wert stehen zusammen mit der beobachteten Strahlensensitivität (erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) im Einklang mit der Verdachtdiagnose Ataxia telangiectasia. Bei einer Mutationsanalyse des ATM-Gens zeigte sich, dass der Betroffene compound-heterozygot für zwei unterschiedliche Mutationen war. Zum einen fand sich in Exon 32 die Mutation 4587T>G, eine Nonsense-Mutation, die zum Abbruch der Proteinsynthese führt. Als zweite Veränderung ließ sich im Exon 8 die Mutation 538C>T, ebenfalls eine Nonsense-Mutation identifizieren (vgl. auch Kap. 2.5, Abb. 2.2).

In Abb. II/12a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

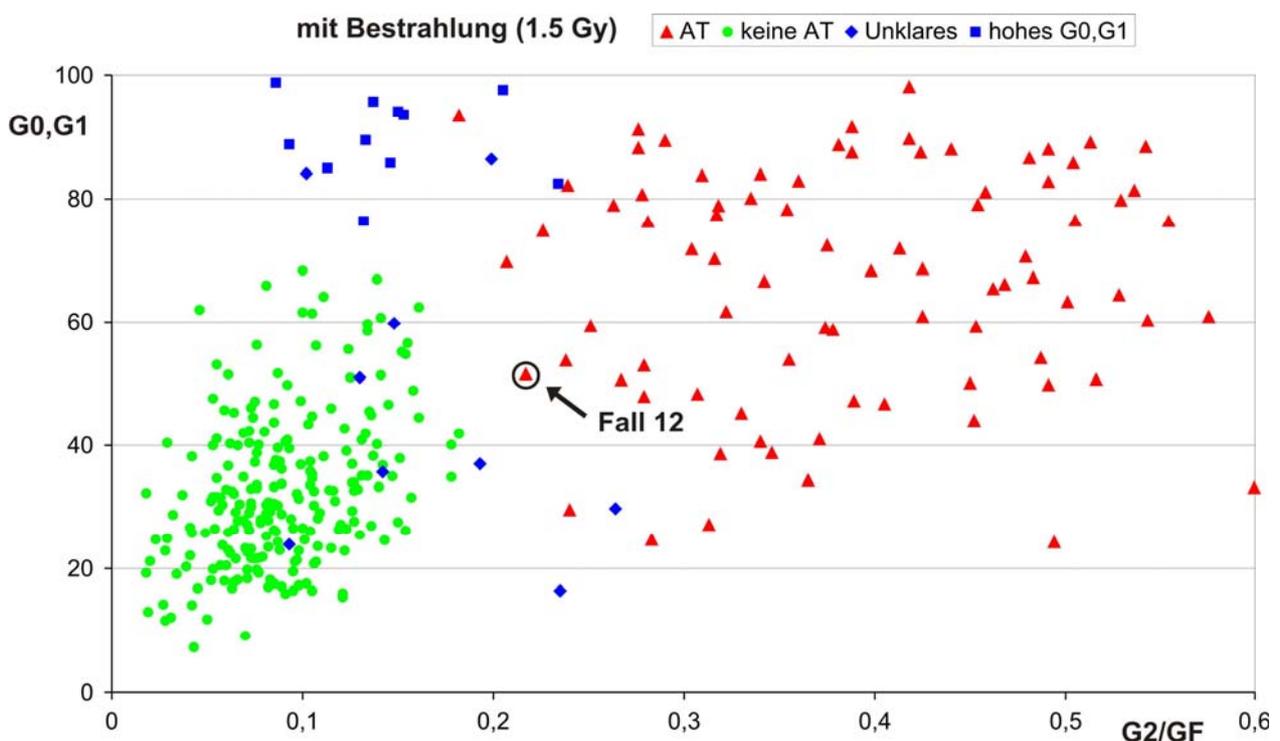


Abb. II/12a Fall 12: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/12b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

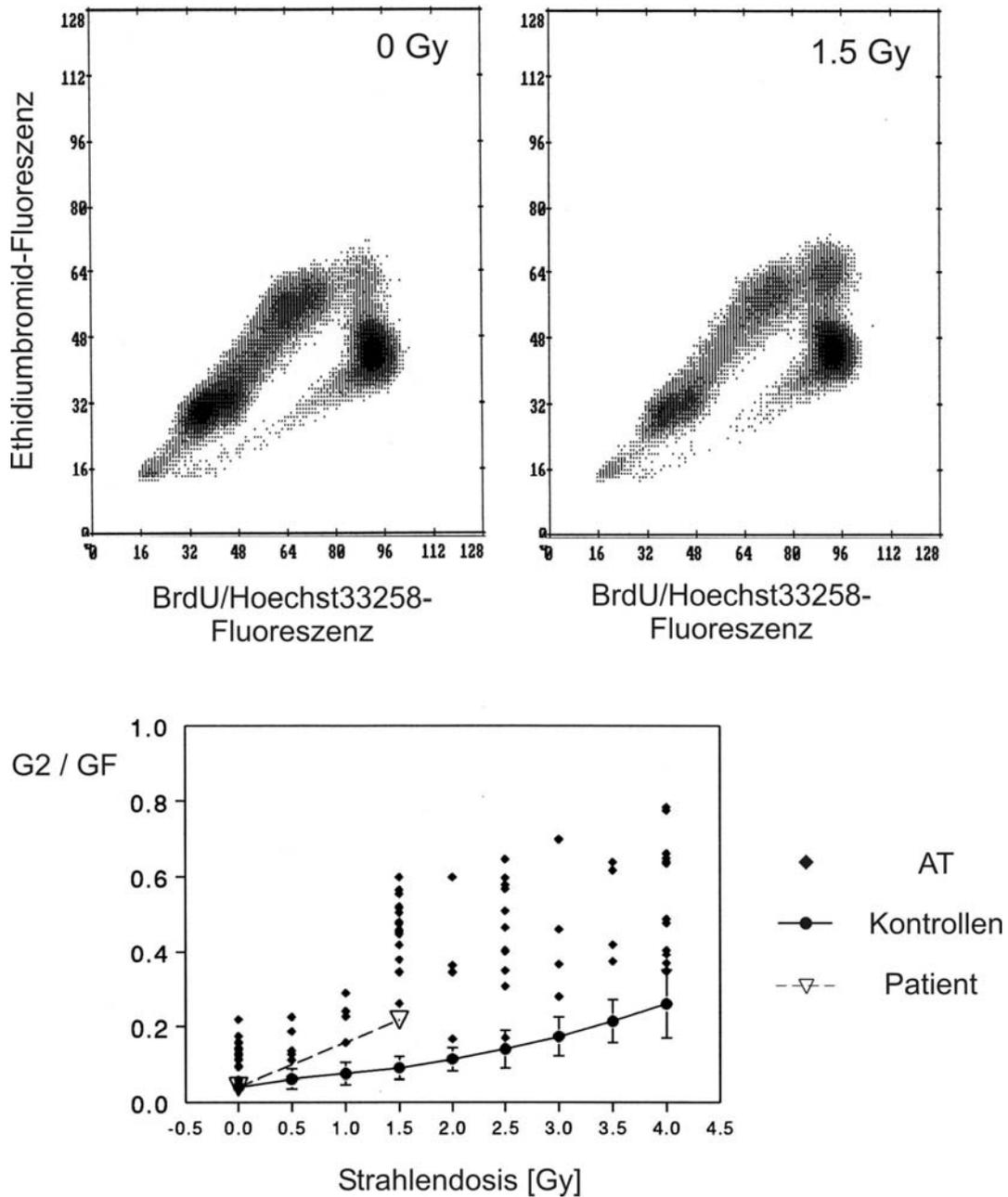


Abb. II/12b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

### Fall 13 [G-01-610]

Es handelt sich um einen 10-jährigen Patienten mit konjunktivalen Teleangiektasien, Ataxie und Kleinhirnhypoplasie. Der AFP-Wert betrug 122.2 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe hinaus erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine überdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn lediglich 17.4% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei: 22.2% (0.5 Gy) und 24.3% (1.5 Gy) 25.1% der unbestrahlten und 17.6% (0.5 Gy) bzw. 10.3% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.301 (0.5 Gy) bzw. 0.494 (1.5 Gy). Diese Werte liegen außerhalb des Normalbereiches. Der erhöhte AFP-Werts und die beobachtete ausgeprägte Strahlensensitivität (stark erhöhte G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>-Ratio nach Bestrahlung) stehen im Einklang mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia. Ungewöhnlich an diesem Fall ist das überdurchschnittlich gute Zellwachstum.

In Abb. II/13a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

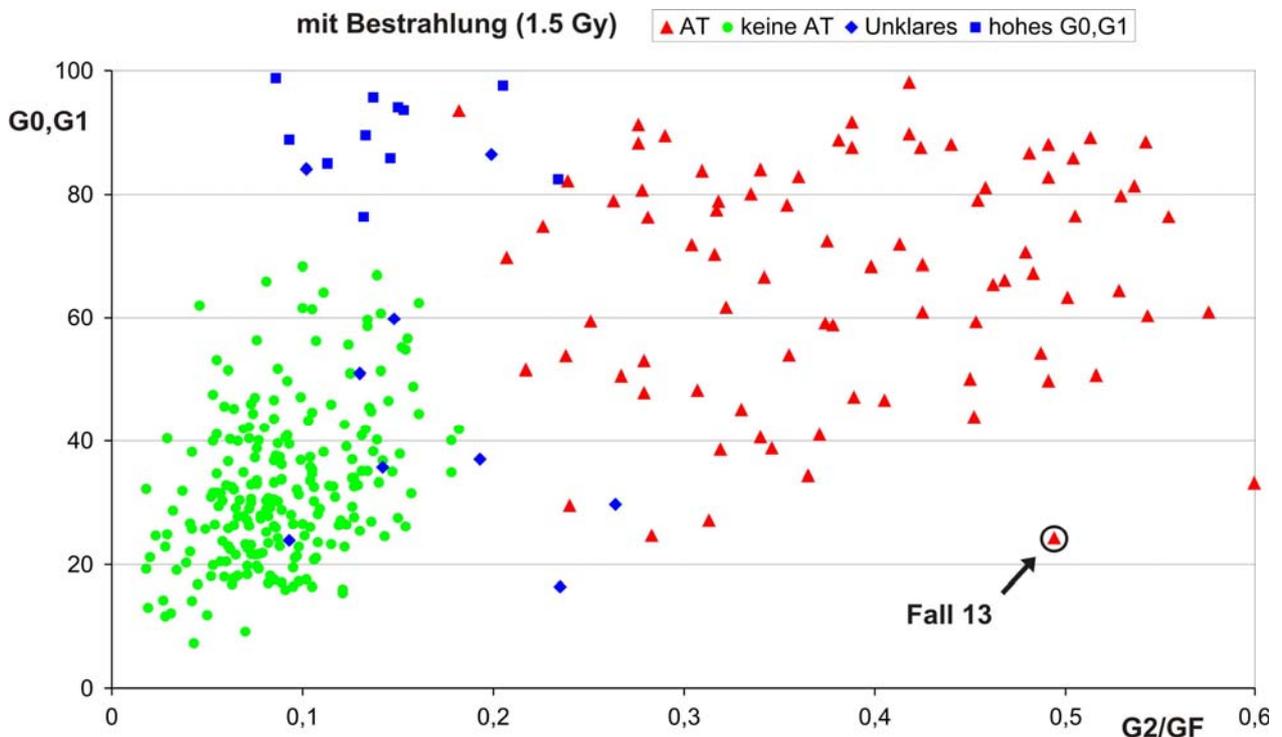


Abb. II/13a Fall 13: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. II/13b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

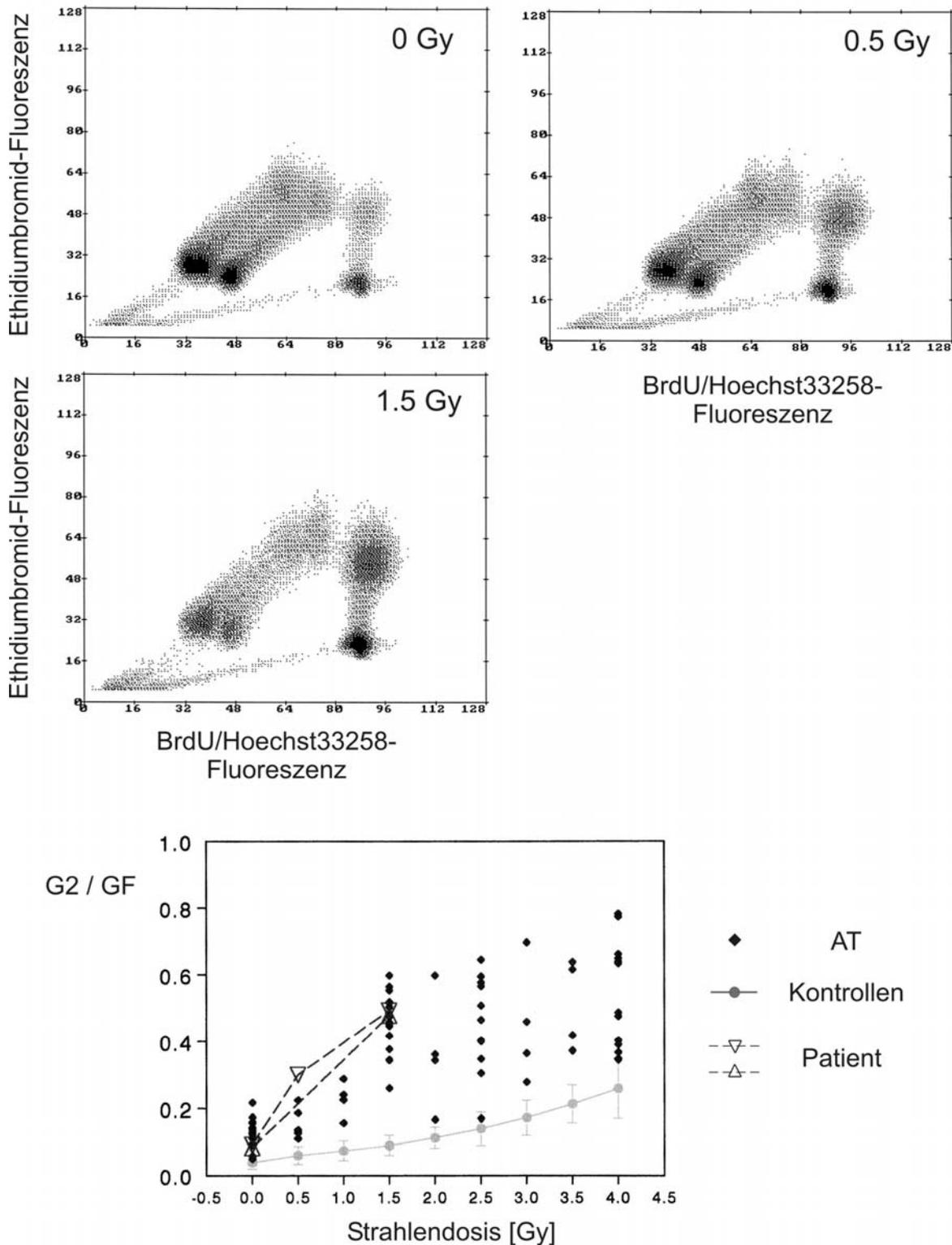


Abb. II/13b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

### Gruppe III: Besonderheiten

Fall 14 [G-02-579; Kategorie: spontane G2-Phasen-Erhöhung]

Es handelt sich um eine 62-jährige Patientin mit nicht näher bezeichnetem klinischen Verdacht auf AT, wobei ein für diese Verdachtsdiagnose ungewöhnlich hohes Alter vorliegt. Der AFP-Wert betrug 4.1 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine überdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn lediglich 10.4% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 16.4% (1.5 Gy). 15.2% der unbestrahlten und 8.1% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.235 (1.5 Gy), der Anteil bestrahlter Zellen, die sich in der G2-Phase des ersten Zellzyklus befanden, lag bei 19.6%. Diese Werte waren jedoch auch schon ohne Bestrahlung erhöht: Ratio G2/GF = 0.176; Anteil unbestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus: 15.8%. Dieser Befund ist auffällig und könnte auf genomische Instabilität hinweisen. Die unter Berücksichtigung des Ausgangswertes geringe Strahlensensitivität und der normale AFP-Wert stehen jedoch im Widerspruch zur Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia.

In Abb. III/14a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

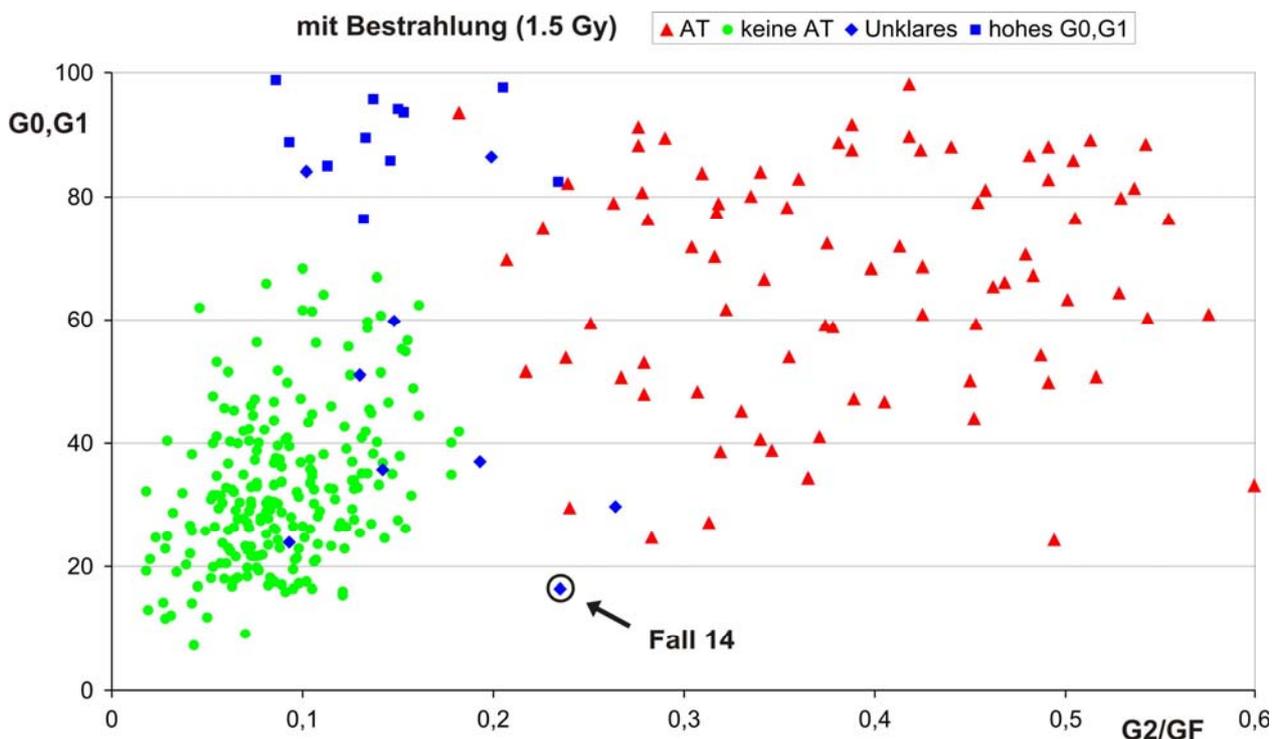


Abb. III/14a Fall 14: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/14b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

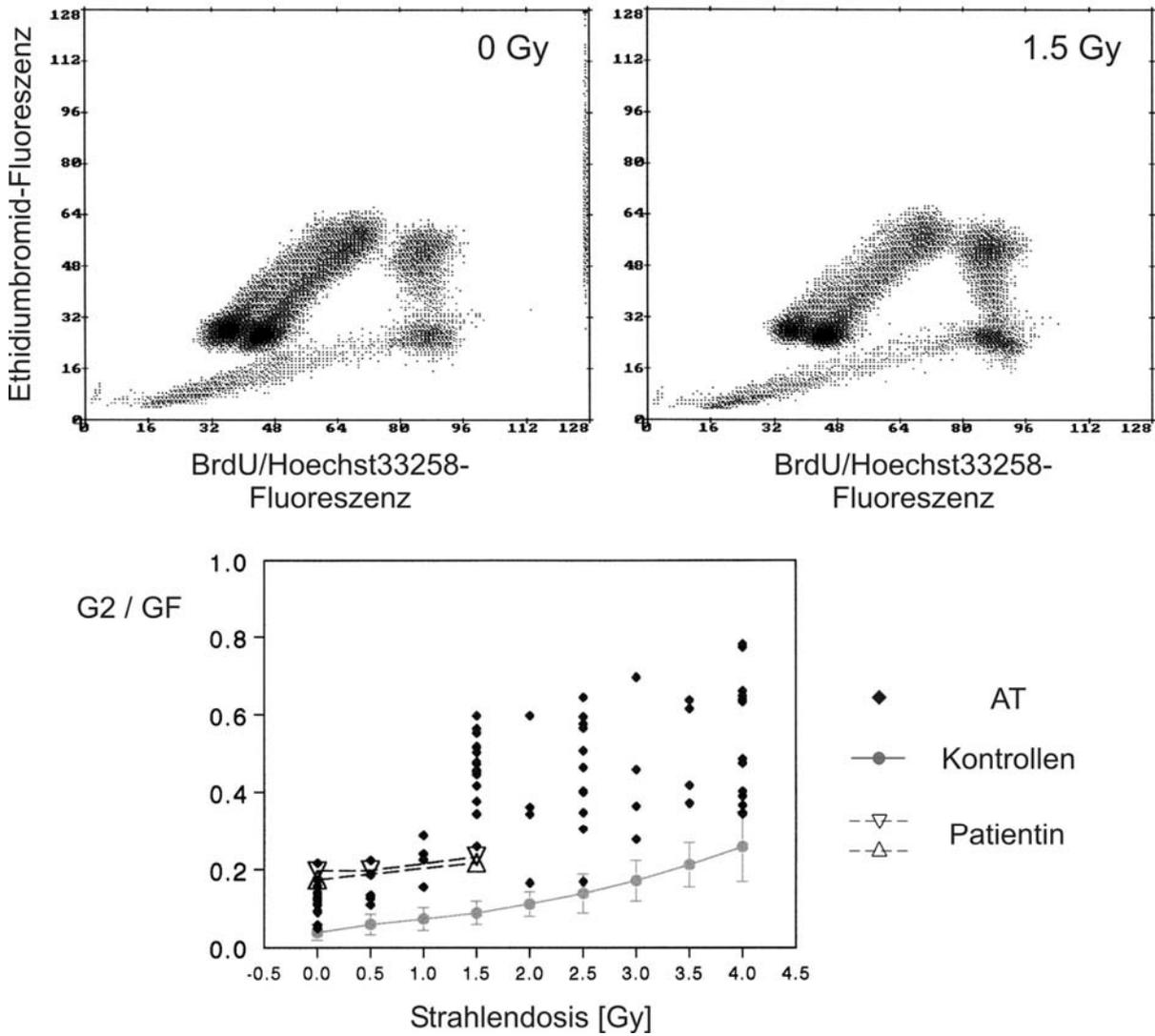


Abb. III/14b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 15 [F-96-75-0; Kategorie: grenzwertige Strahlensensibilität bei erhöhtem AFP]

Es handelt sich um einen 13-jährigen Patienten mit nicht näher beschriebenem klinischen Verdacht auf Louis-Bar-Syndrom. Der AFP-Wert betrug 982 ng/ml und ist damit deutlich über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 81.2% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 84.1% (1.5 Gy), 89.7% (2.5 Gy) und 92.4% (4.0 Gy). 2.7% der unbestrahlten und 0.7% (1.5 Gy), 0.3% (2.5 Gy) bzw. 0.0% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.102 (1.5 Gy), 0.228 (2.5 Gy) bzw. 0.458 (4.0 Gy). Auffällig an diesem Ergebnis ist die bei einer Dosis von 1.5 Gy noch normale Strahlensensitivität, die erst zu höheren Dosen über den Normalbereich hinaus ansteigt. Das unterdurchschnittliche Zellwachstum und die insgesamt beobachtete Strahlensensitivität (erhöhte G2/GF-Ratio nach Bestrahlung) stehen wie der stark erhöhte AFP-Wert im Einklang mit der Verdachtdiagnose Ataxia telangiectasia.

In Abb. III/15a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

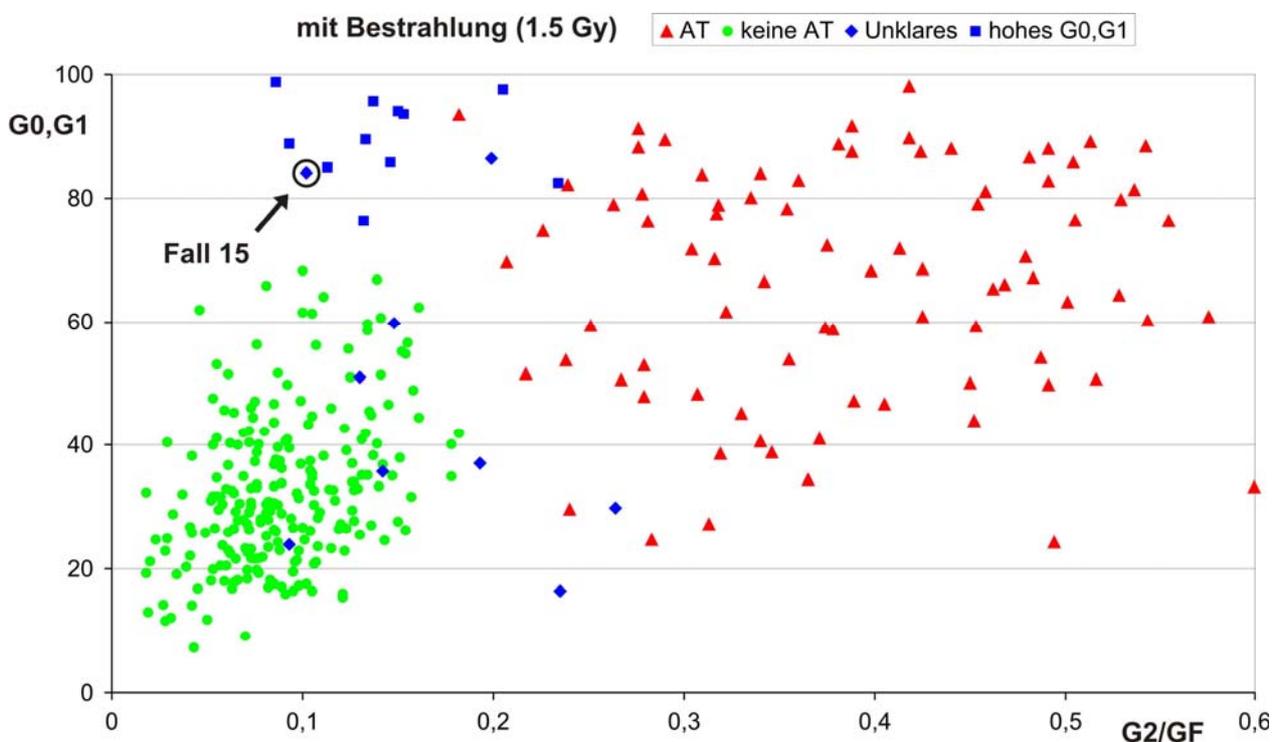


Abb. III/15a Fall 15: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/15b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

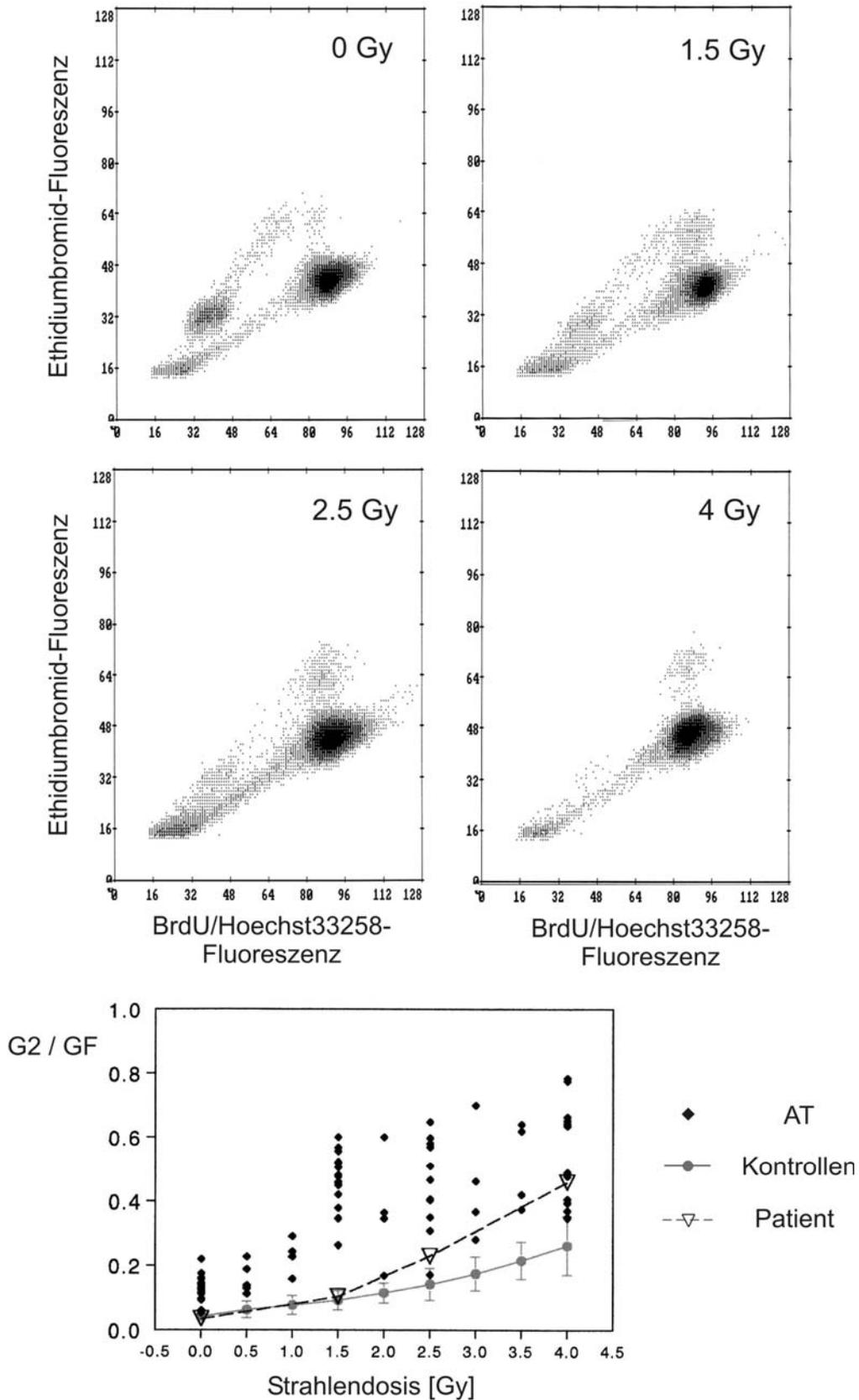


Abb. III/15b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 16 [G-03-326; Kategorie: grenzwertige Strahlensensibilität bei erhöhtem AFP]

Es handelt sich um einen 17-jährigen Patienten mit Ataxie, Nystagmus und verwaschener Sprache. Der AFP-Wert betrug 63.9 ng/ml und ist damit über den Normalbereich der Altersgruppe erhöht. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine leicht verminderte Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 41.1% der unbestrahlten und 35.7% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. 21.1% der unbestrahlten und 9.7% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.142 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt noch im Normalbereich. Da jedoch vorangegangene Untersuchungen kein eindeutiges Ergebnis erbracht hatten und auch der AFP-Wert über den Normalbereich hinaus erhöht war, wurde die Strahlensensitivität der Zellen über einen Bereich von 0.5–8 Gy getestet. Über den gesamten Bereich verlief die Kurve an der oberen Grenze bzw. knapp über dem Normbereich, aber parallel zur Mittelwertskurve normaler Kontrollen. Die erhaltenen Ergebnisse stellen sicher keinen klassischen Befund bei AT dar, lassen aber milde ATM-Mutation nicht völlig ausgeschlossen erscheinen. Derzeit sind noch weitere Untersuchungen zum Nachweis (Immunoblot) und zur Funktion (p53-Phosphorylierung) des ATM-Proteins anhängig.

In Abb. III/16a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

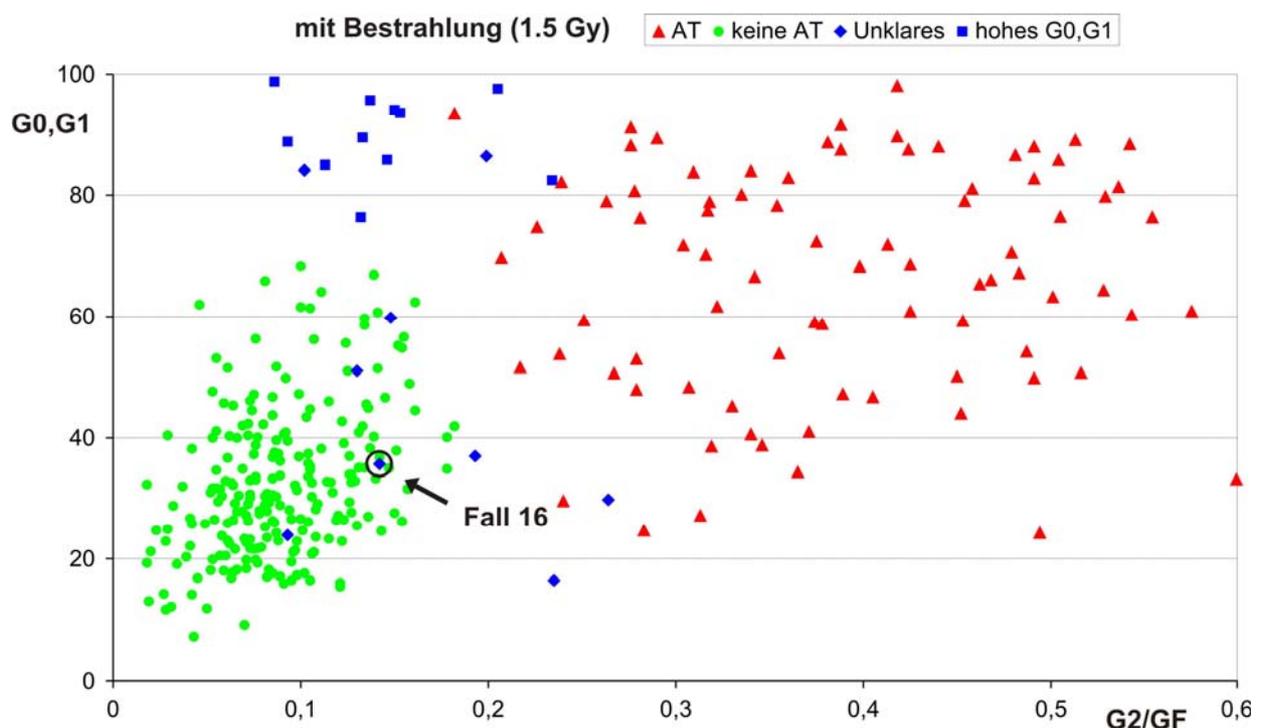


Abb. III/16a Fall 16: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/16b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme, Abb. III/16c den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

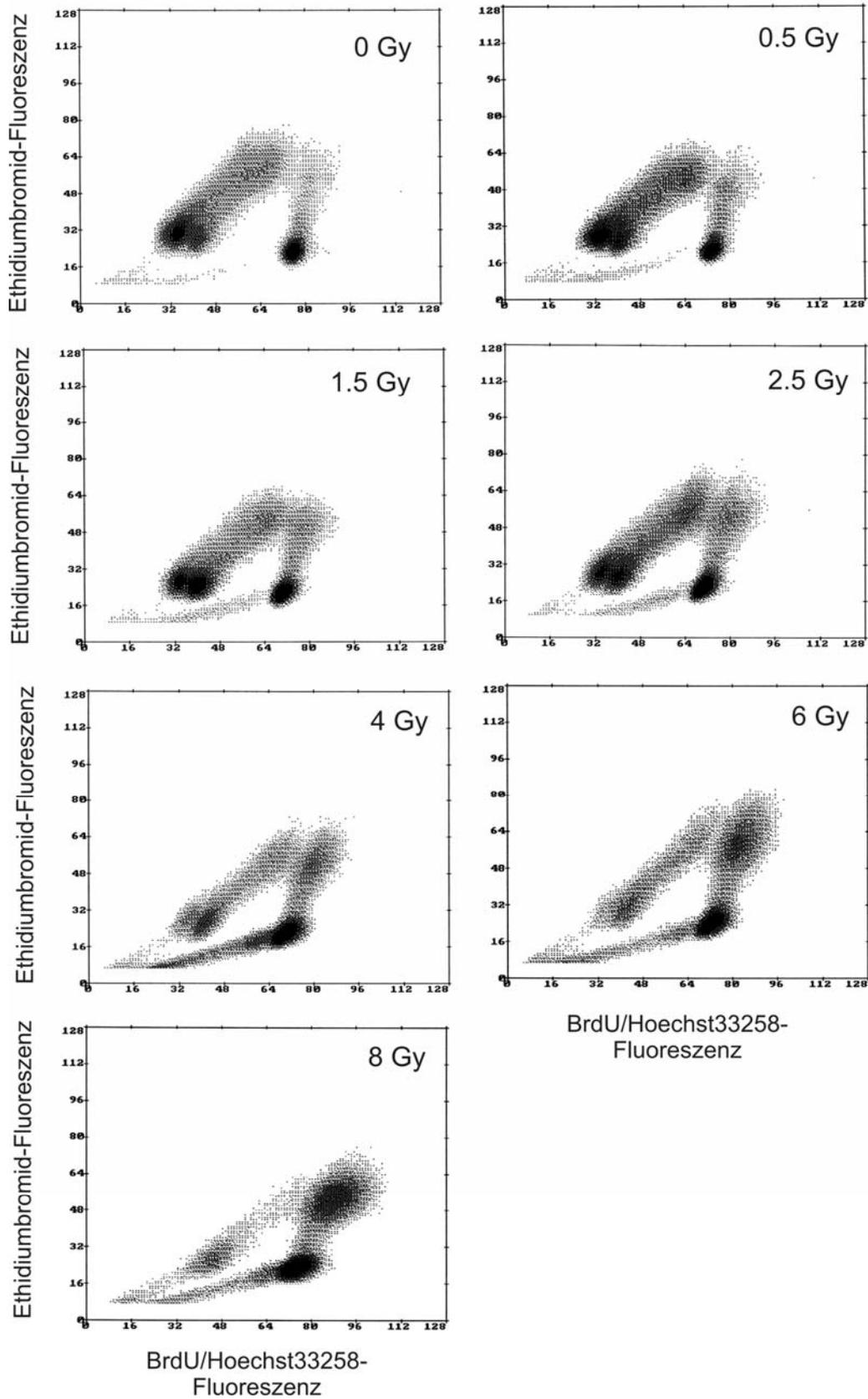


Abb. III/16b Zellzyklusanalyse

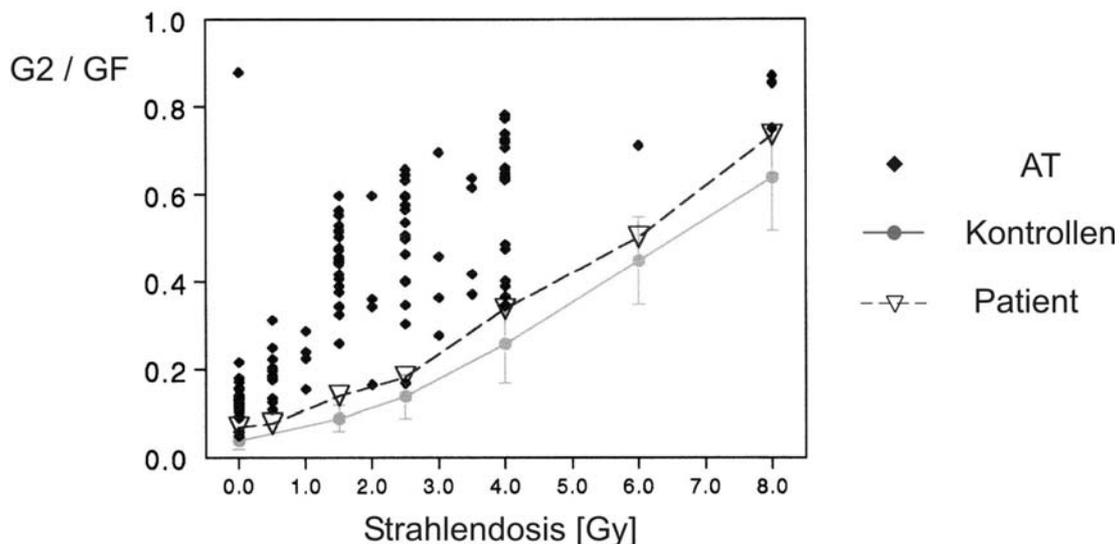


Abb. III/16c Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 17 [F-95-41-0/1; Kategorie: grenzwertige Strahlensensibilität bei niedrigem AFP-Wert]

Es handelt sich um eine 7-jährige Patientin mit rezidivierenden Atemwegs-Infektionen, Kleinhirnhypoplasie und Wachstumsretardierung. Der AFP-Wert betrug  $<4$  ng/ml. Es wurden zweimal Untersuchungen auf Strahlensensitivität peripherer Blutzellen durchgeführt.

Bei der 1. Untersuchung zeigten die Lymphozyten der Patientin, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 34.3% der unbestrahlten und 37.0% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. 28.5% der unbestrahlten und 14.7% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.193 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt an der Grenze des Normalbereichs.

Bei der 2. Untersuchung zeigten die Lymphozyten des Patienten weiterhin eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 41.8% der unbestrahlten und 59.8% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. 7.5% der unbestrahlten und 2.8% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug jetzt 0.148 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt noch innerhalb des Normalbereichs. Zusammen mit dem normalen AFP-Wert spricht dies zwar gegen die Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia, jedoch können bei der vorliegenden geringen Strahlensensitivität andere Syndrome

wie etwa NBS (bei allerdings atypischer Klinik) insgesamt nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In Abb. III/17a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

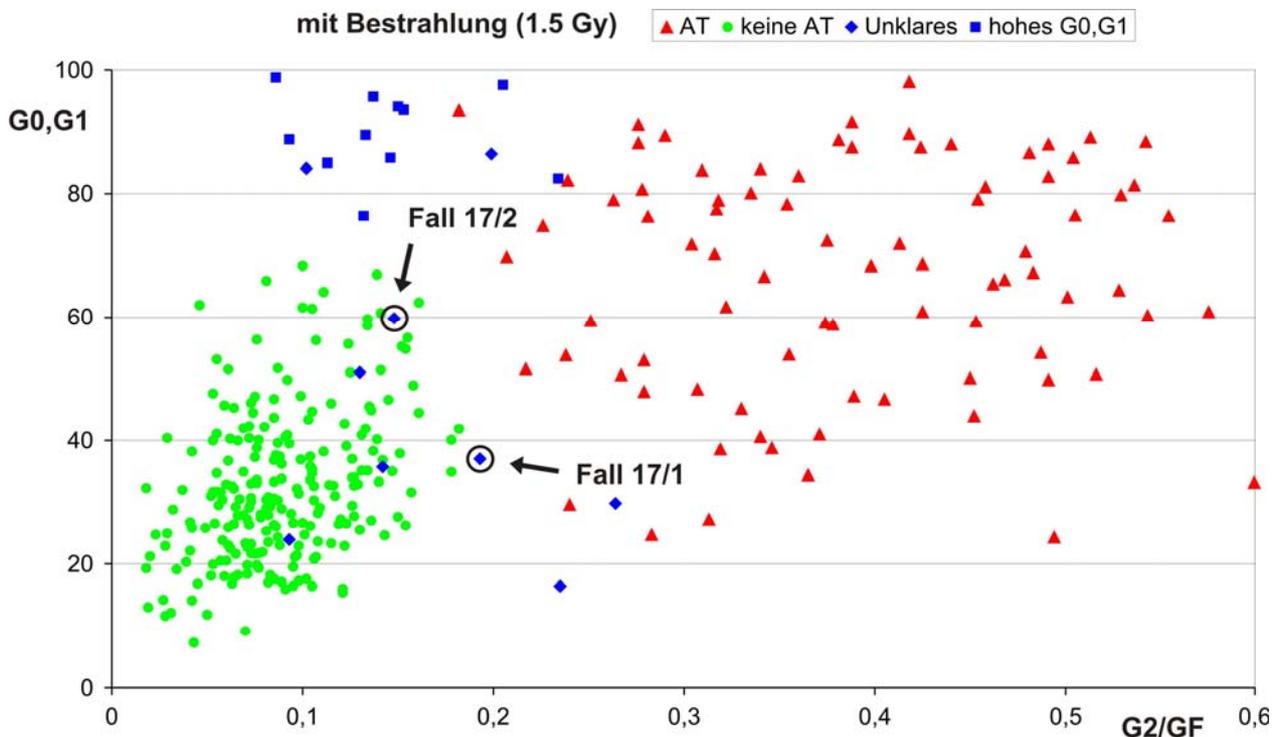


Abb. III/17a Fall 17: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/17b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme der 1. Untersuchung sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen; Abb. III/17c gibt die Ergebnisse der 2. Untersuchung wieder.

# 1. Untersuchung

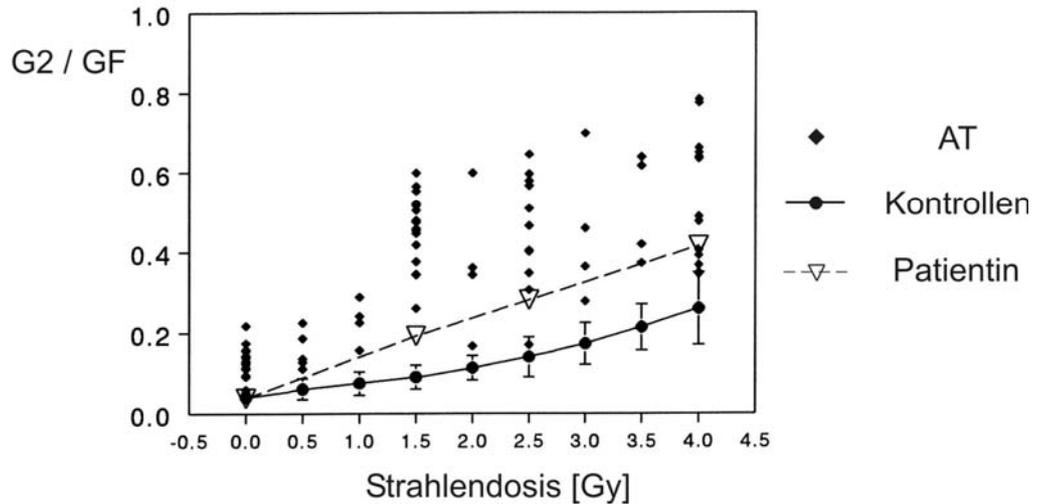
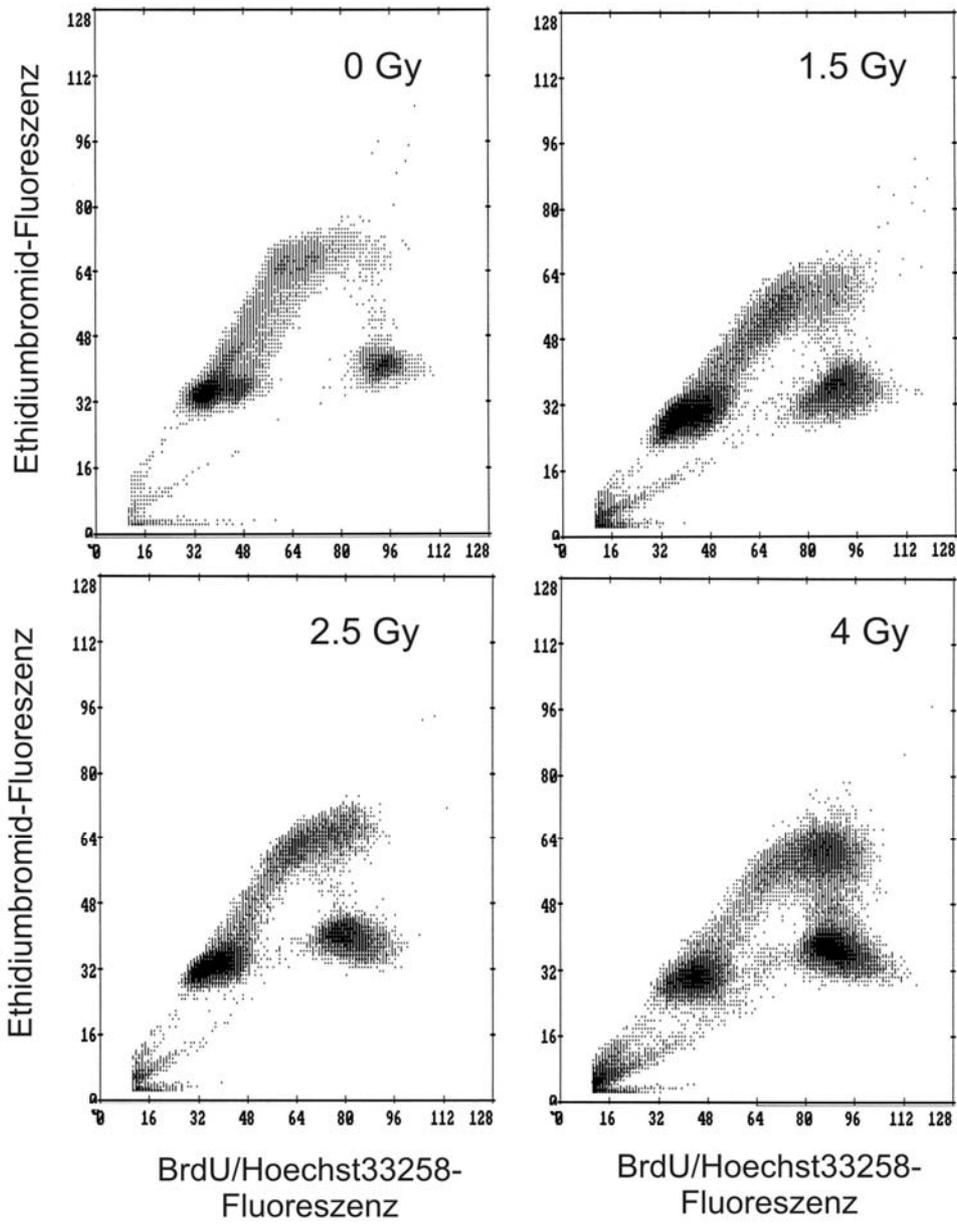


Abb. III/17b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## 2. Untersuchung

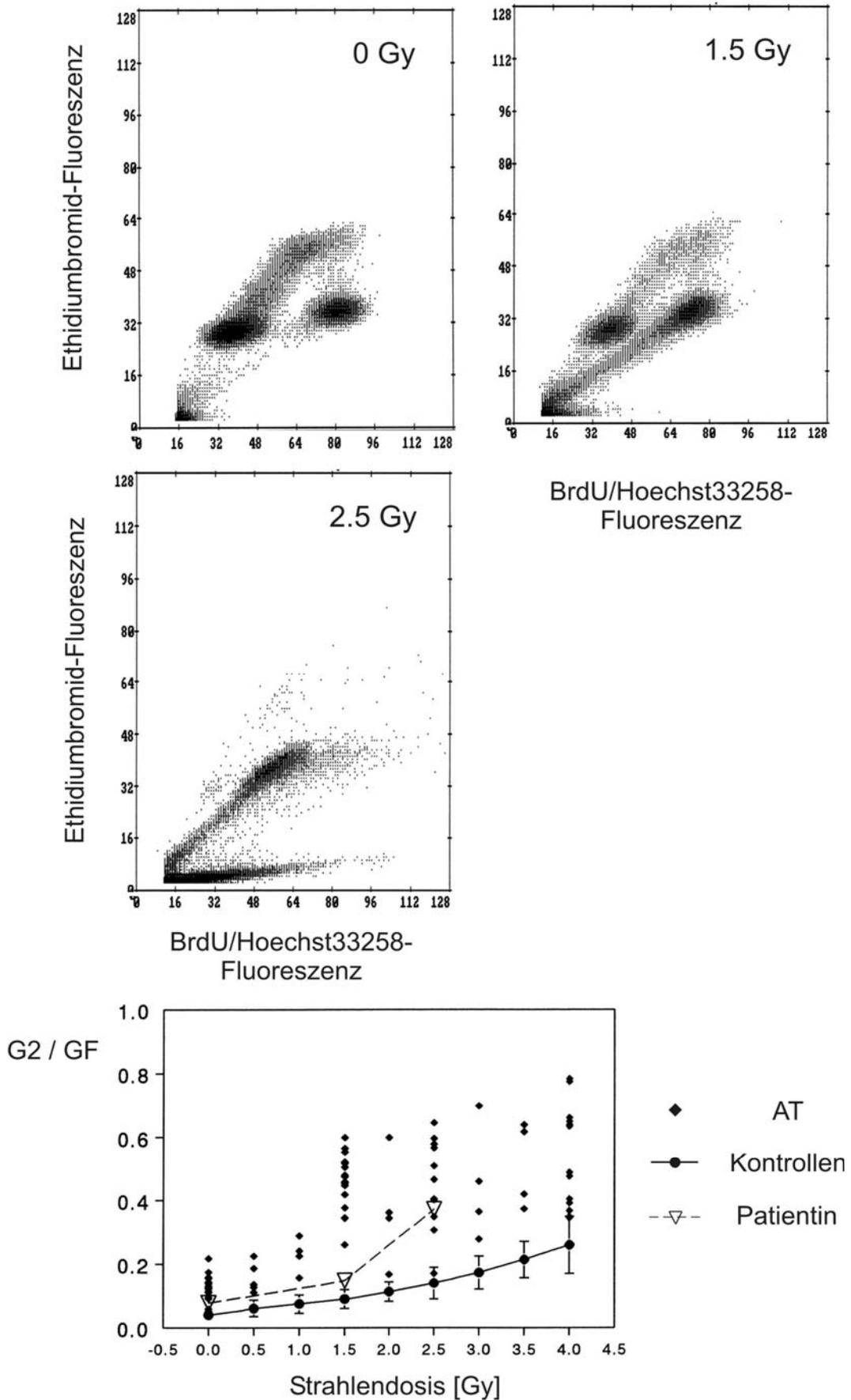


Abb. III/17c Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 18 [F-97-136; Kategorie: hohe G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Phase mit Zellzerfall]

Es handelt sich um einen 13-jährigen Patienten mit dystoner Bewegungsstörung/Athetosen, beinbetonter Spastik und gesteigerten Muskeleigenreflexen. Der AFP-Wert betrug <4 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 74.6% der unbestrahlten Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. Dieser Wert lag nach Bestrahlung bei 76.4% (1.5 Gy), 77.7% (2.5 Gy) und 81.3% (4.0 Gy). 3.8% der unbestrahlten und 2.1% (1.5 Gy), 2.0% (2.5 Gy) bzw. 0.3% (4.0 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub>) betrug 0.132 (1.5 Gy), 0.135 (2.5 Gy) bzw. 0.210 (4.0 Gy). Der normale AFP-Wert und die fehlende Strahlensensitivität stehen im Widerspruch zur Verdachtdiagnose Ataxia telangiectasia; untypisch wäre auch das klinische Bild. Auffällig an dem Ergebnis ist jedoch außer dem deutlich unterdurchschnittlichen Zellwachstum auch das Bild der Zellzyklusanalyse (Abb. III/18b), welches innerhalb des Zerfalls von Zellen einen eigenartigen Zellcluster nahe der G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Population zeigt, der mit zunehmender Bestrahlungsdosis an Intensität zunimmt.

In Abb. III/18a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) gegen den Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

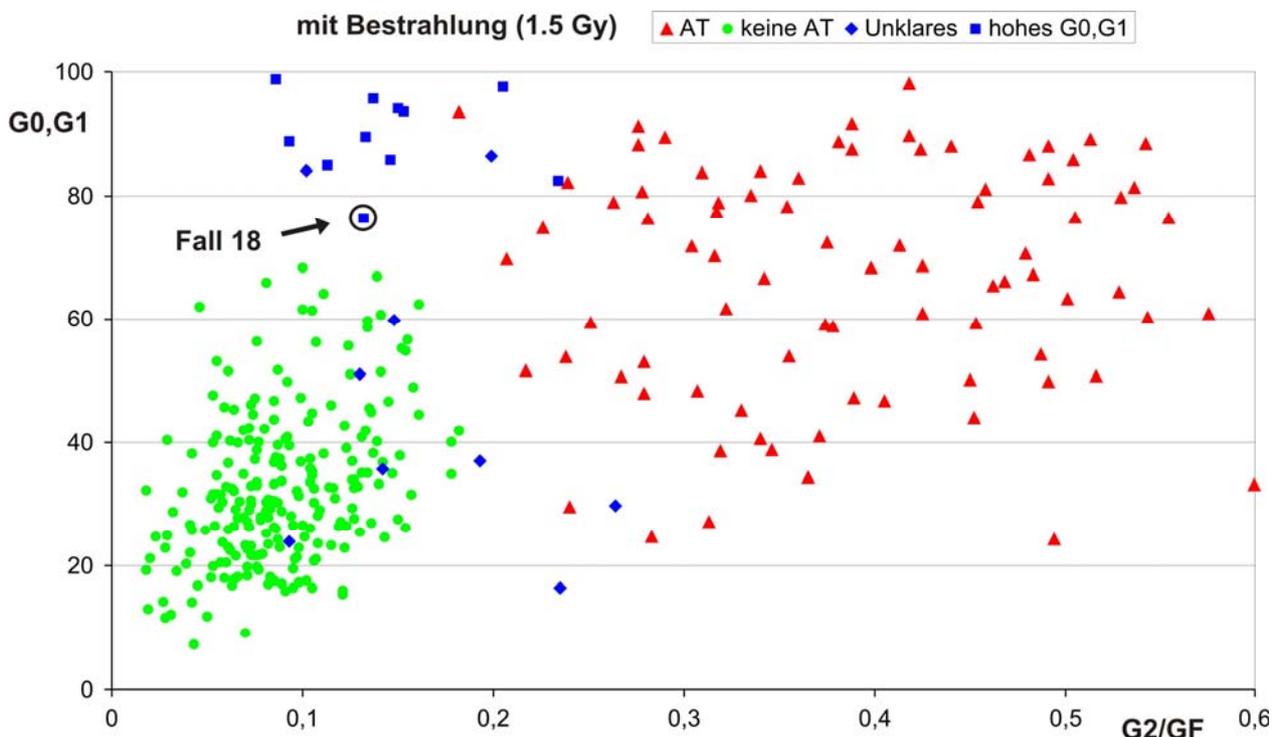


Abb. III/18a Fall 18: Auftragung von G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> gegen G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/18b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

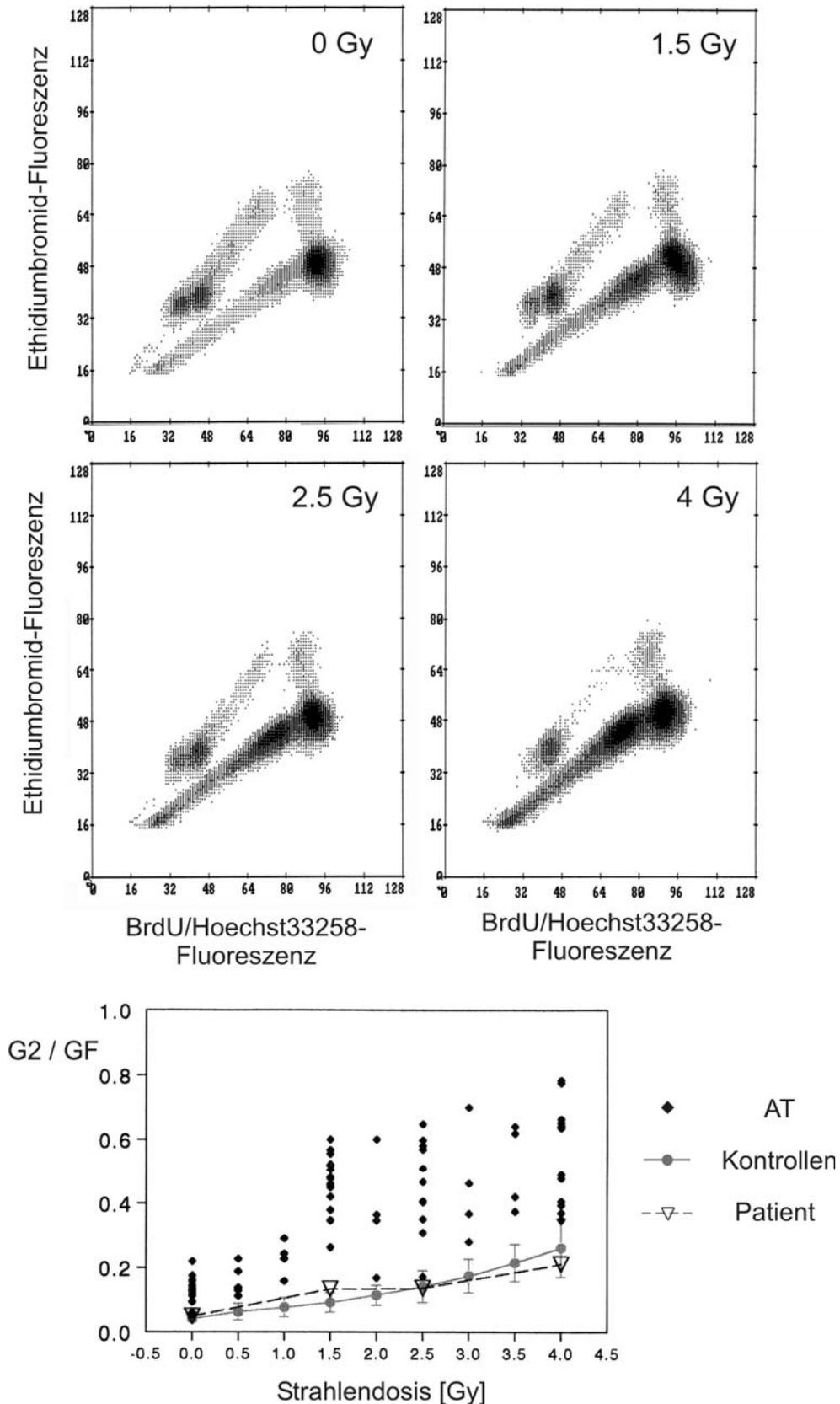


Abb. III/18b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 19 [F-00-70-0; Kategorie: hohe G0,G1-Phase mit Zellzerfall; Auswertbarkeit]

Es handelt sich um einen knapp 2-jährigen Patienten mit einem unklaren T-Zell-Defekt, Teleangiektasien, aber keinen neurologischen Auffälligkeiten. Der AFP-Wert betrug  $< 4$  ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine extrem geringe Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 98.1% der unbestrahlten und 98.8% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. 0.0% der unbestrahlten und 0.0% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.086 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt im Normalbereich und spricht zusammen mit dem niedrigen AFP-Wert insgesamt gegen die Verdachtdiagnose Ataxia telangiectasia; die geringe Proliferation der Lymphozyten steht jedoch im Einklang mit dem Vorliegen eines T-Zell-Defekts. Grundsätzlich ist allerdings bei einer solch geringen Stimulierbarkeit der Zellen auch darüber nachzudenken, inwieweit eine fundierte Aussage über die Strahlensensitivität der Lymphozyten unter derartigen Bedingungen (d.h. Vorliegen einer die Lymphozyten betreffenden Begleiterkrankung) überhaupt getroffen werden kann.

In Abb. III/19a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

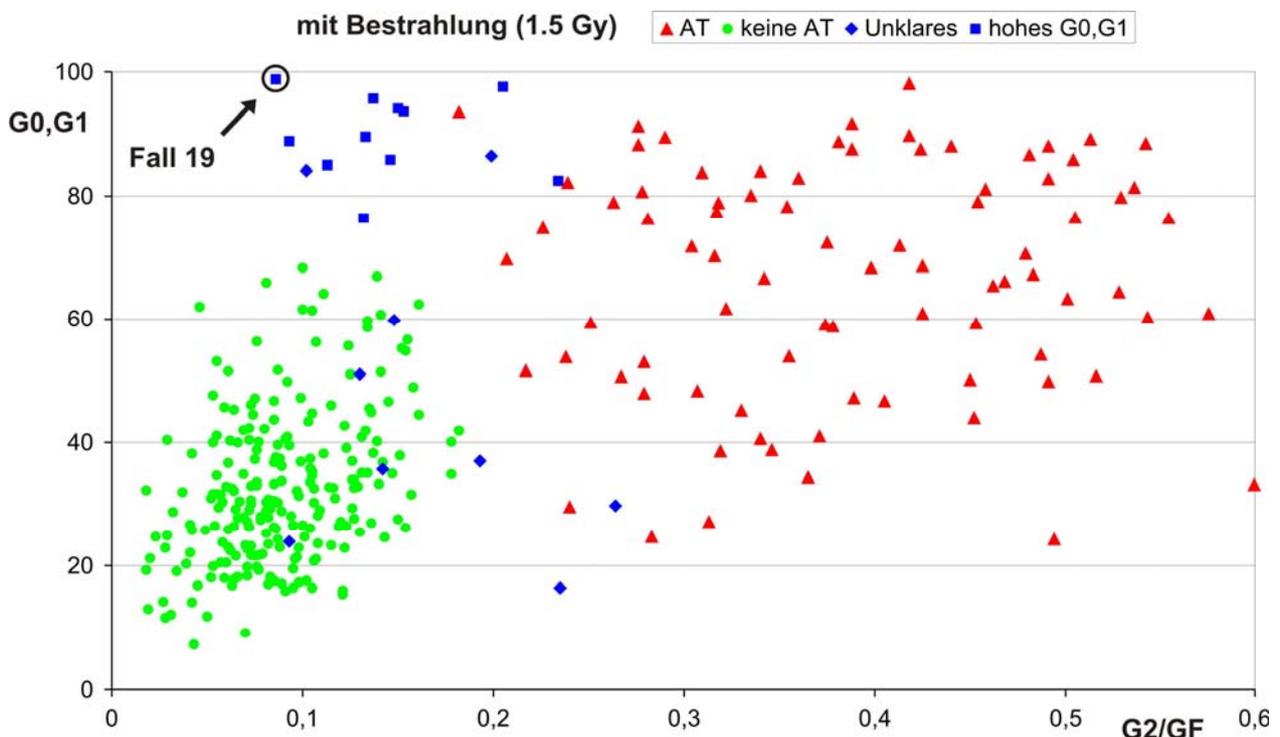


Abb. III/19a Fall 19: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/19b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

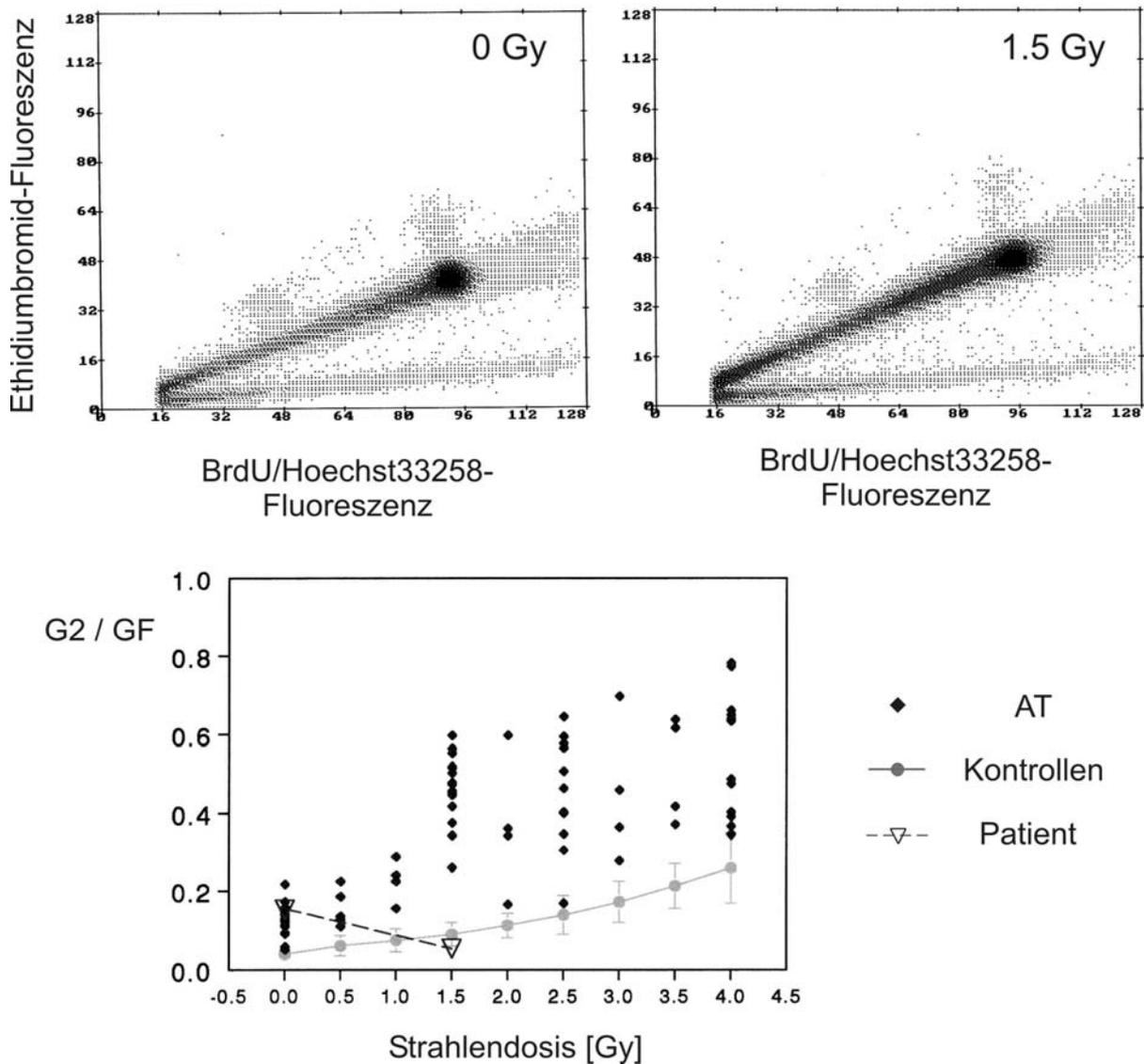


Abb. III/19b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 20 [G-02-118; Kategorie: hohe G0,G1-Phase; Auswertbarkeit bei bestehender Leukämie]

Es handelt sich um eine 9-jährige Patientin mit AML bei bestehendem komplexen Herzfehler. Die Untersuchung auf Strahlensensitivität erfolgte hier aufgrund einer geplanten Radiatio. Der AFP-Wert betrug 7.1 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine stark unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 94.5% der unbestrahlten und 97.6% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. 0.5% der unbestrahlten und 0.0% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.205 (1.5 Gy). Die geringe Stimulierbarkeit und Strahlensensitivität der mononukleären Zellen des peripheren Blutes sind in diesem Fall wahrscheinlich Ausdruck der vorliegenden akuten Leukämie. Die erhaltenen Werte sind darüberhinaus nur eingeschränkt mit Normalwerten bzw. strahlensensitiven positiven Kontrollen vergleichbar, da beide für Lymphozyten und nicht für leukämische Blasten gelten.

In Abb. III/20a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

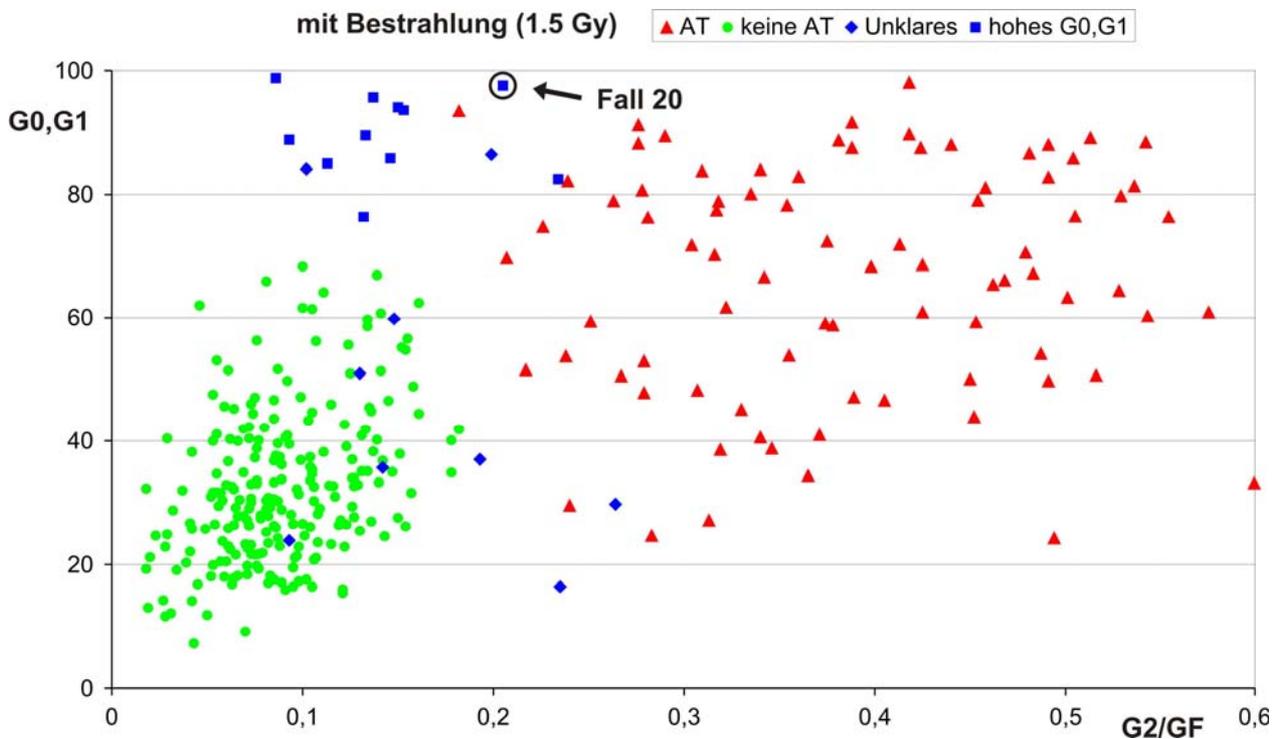


Abb. III/20a Fall 20: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/20b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

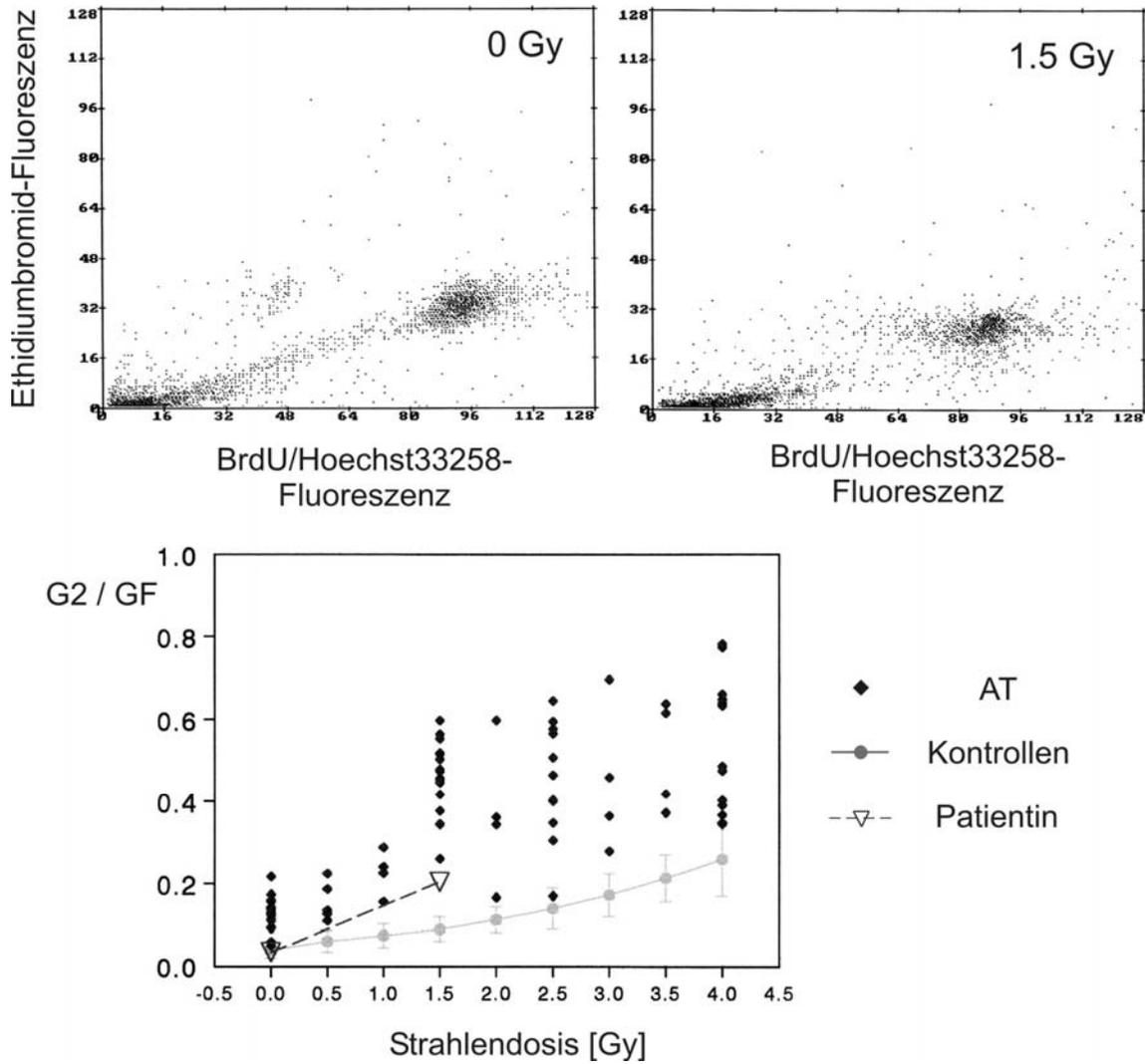


Abb. III/20b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 21 [G-02-1131; Kategorie: hohe G0,G1-Phase; Begleiterkrankung T-Zell-Lymphom]

Es handelt sich um eine 4-jährige Patientin mit kutanem T-Zell-Lymphom und Immundefekt mit Hypogammaglobulinämie. Der AFP-Wert betrug 2.6 ng/ml und liegt damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten der Patientin zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. 72 Stunden nach Kulturbeginn waren 75.7% der unbestrahlten und 86.4% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. 5.1% der unbestrahlten und 1.9% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.199 (1.5 Gy). Klassische Ataxia telangiectasia scheidet aufgrund des normalen AFP-Wertes aus. Die geringe Stimulierbarkeit und grenzwertige Strahlensensitivität der mononukleären Zellen des peripheren Blutes könnten jedoch Ausdruck eines anderen Chromosomenbrüchigkeitssyndroms (z. B. NBS, FA) sein.

In Abb. III/21a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

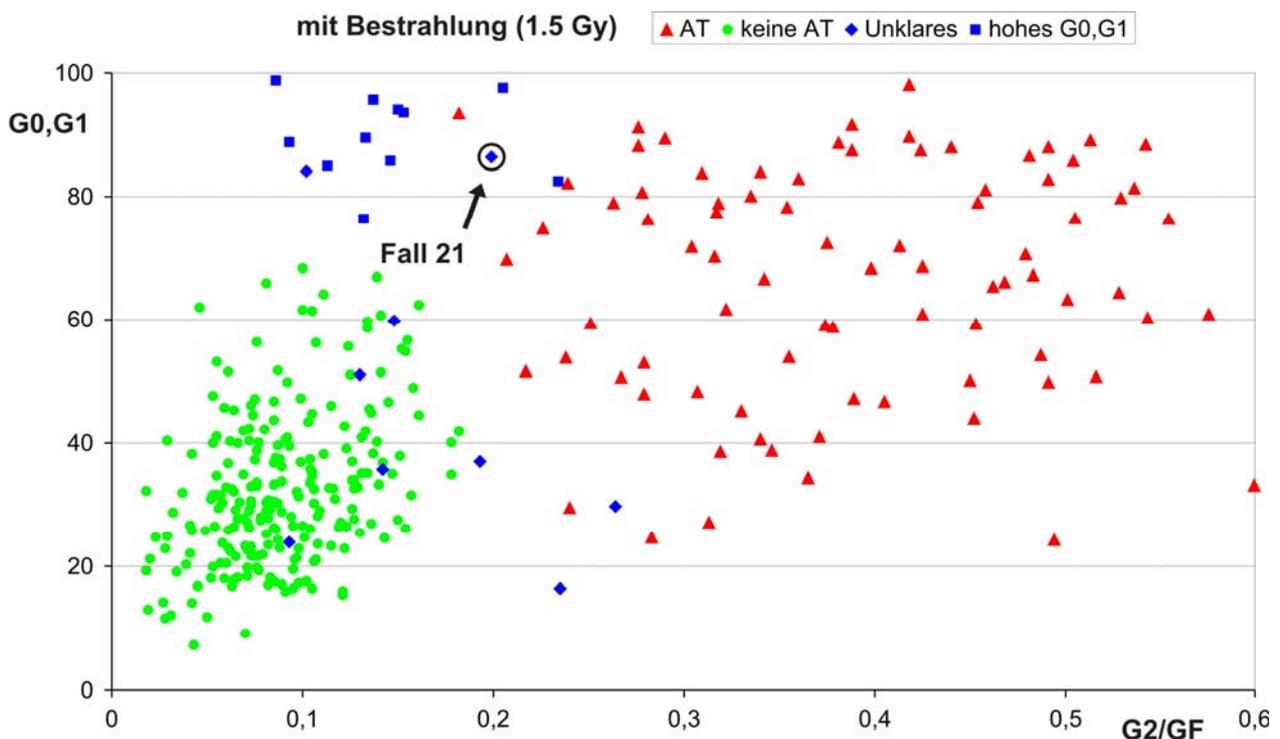


Abb. III/21a Fall 21: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/21b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen.

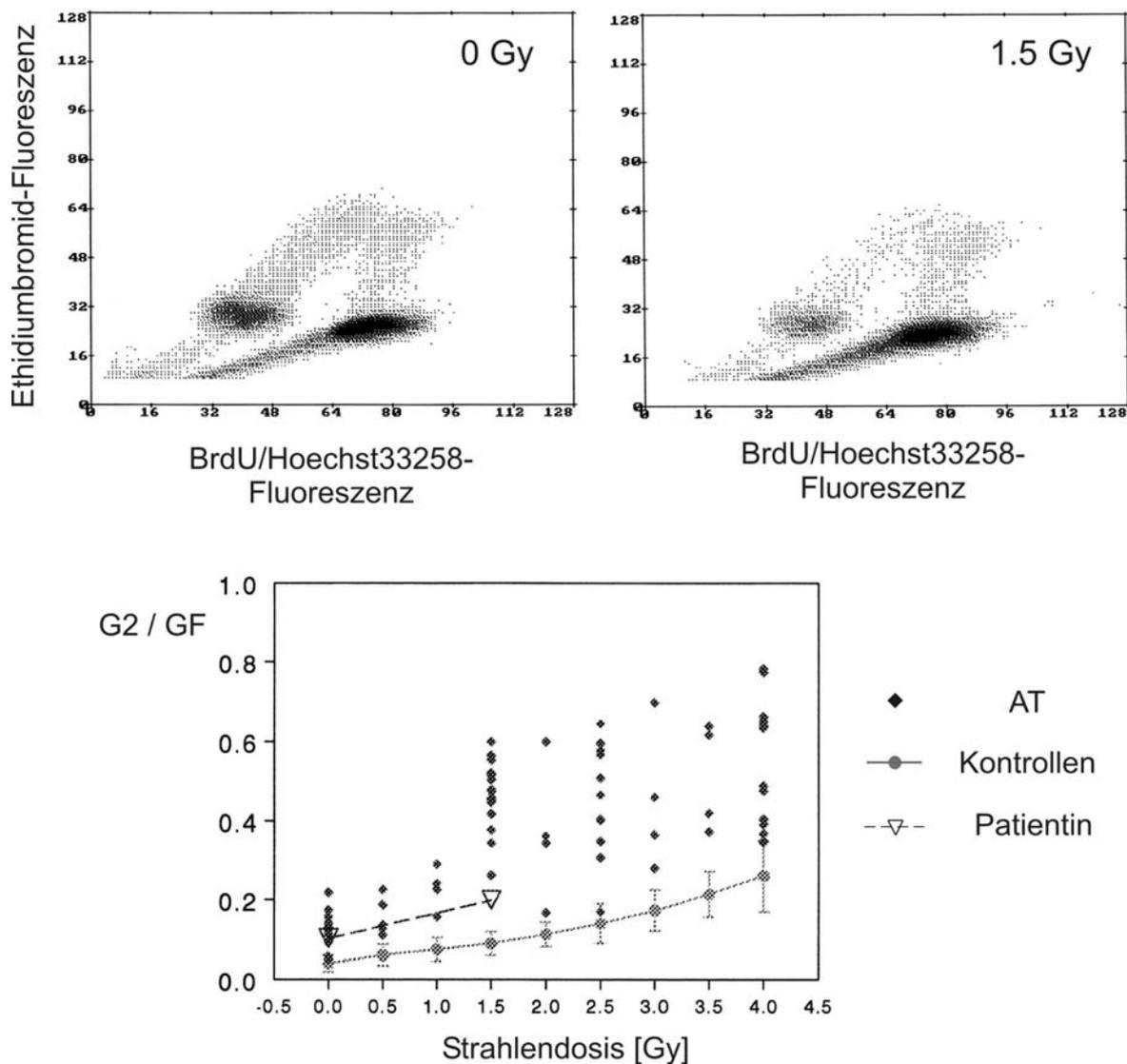


Abb. III/21b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

Fall 22 [G-04-420; Kategorie: technische Probleme; geronnenes Blut]

Es handelt sich um einen 2-jährigen Patienten mit rezidivierenden bronchopulmonalen Infektionen, konjunktivalen Teleangiektasien und leichter Ataxie. Es wurden zweimal Untersuchungen auf Strahlensensitivität peripherer Blutzellen durchgeführt.

Bei der 1. Untersuchung (Blut war mehrere Tage unterwegs und teilweise geronnen) betrug der AFP-Wert 6.6 ng/ml und lag damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn 30.7% der unbestrahlten und 82.5% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>-Kompartiment verblieben. 31.7% der unbestrahlten und 1.0% (1.5 Gy) der bestrahlten Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im dritten Zellzyklus. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des ersten

Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.234 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt knapp außerhalb des Normalbereichs. Da eine exogene Beeinflussung der Messergebnisse (geronnenes Blut) nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, wurde die Untersuchung wiederholt.

Bei der 2. Untersuchung betrug der AFP-Wert 4.9 ng/ml und lag damit im Normalbereich der Altersgruppe. Die Lymphozyten des Patienten zeigten, bezogen auf das Lebensalter, jetzt eine normale Stimulierbarkeit. So waren 72 Stunden nach Kulturbeginn nur 18.6% der unbestrahlten und 22.9% der bestrahlten (1.5 Gy) Ausgangszellpopulation im ursprünglichen G0,G1-Kompartiment verblieben. Das Verhältnis des Anteils bestrahlter Zellen in der G2-Phase des ersten Zellzyklus zum Anteil der proliferierenden Zellen (Ratio G2/GF) betrug 0.098 (1.5 Gy). Dieser Wert liegt nunmehr innerhalb des Normalbereichs, es liegt keine erhöhte Strahlensensitivität vor. Zusammen mit dem normalen AFP-Wert spricht dies gegen die Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia.

In Abb. III/22a ist der bei einer Dosis von 1.5 Gy ermittelte Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen den Wert G2/GF aufgetragen und zu anderen Fällen in Beziehung gesetzt.

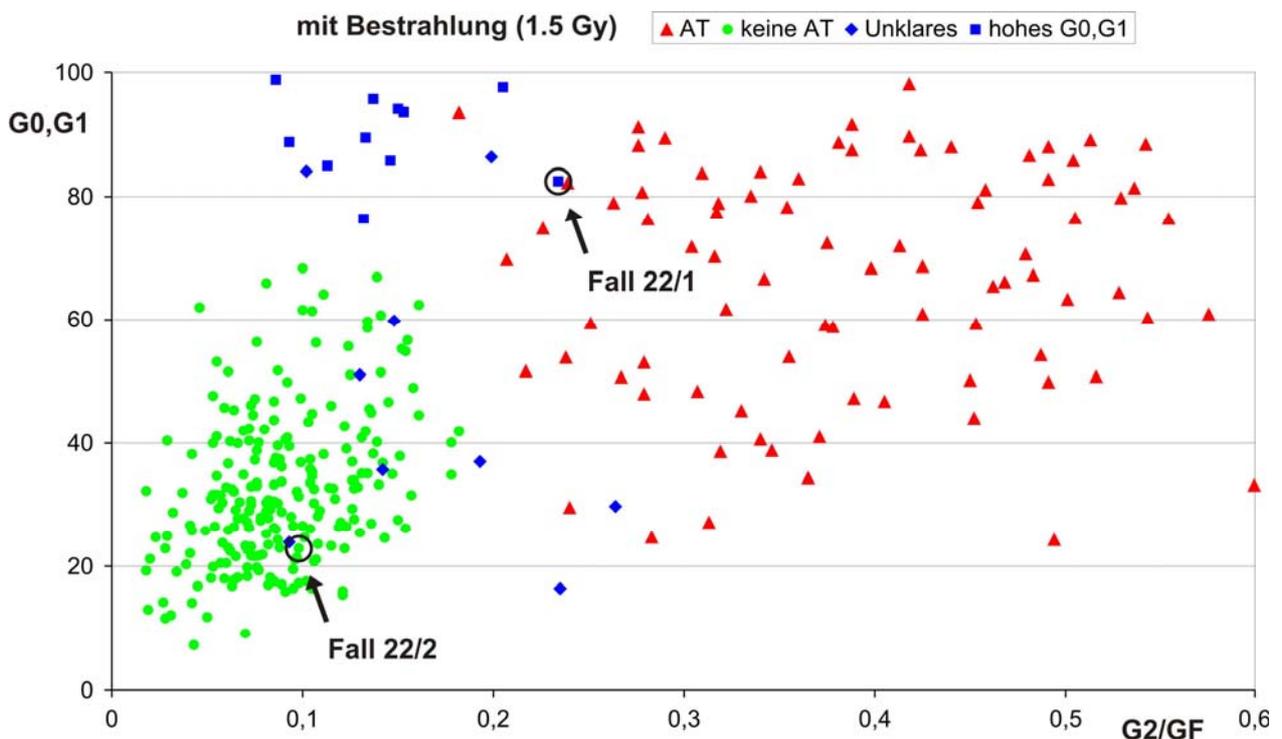


Abb. III/22a Fall 22: Auftragung von G0,G1 gegen G2/GF im Vergleich zur Gesamtheit der Fälle.

Abb. III/22b zeigt die der Zellzyklusanalyse zugrundeliegenden Zytogramme der 1. Untersuchung sowie den dosisabhängigen Verlauf der G2/GF-Werte im Vergleich zu negativen Kontrollen und AT-positiven Fällen; Abb. III/22c gibt die Ergebnisse der 2. Untersuchung wieder.

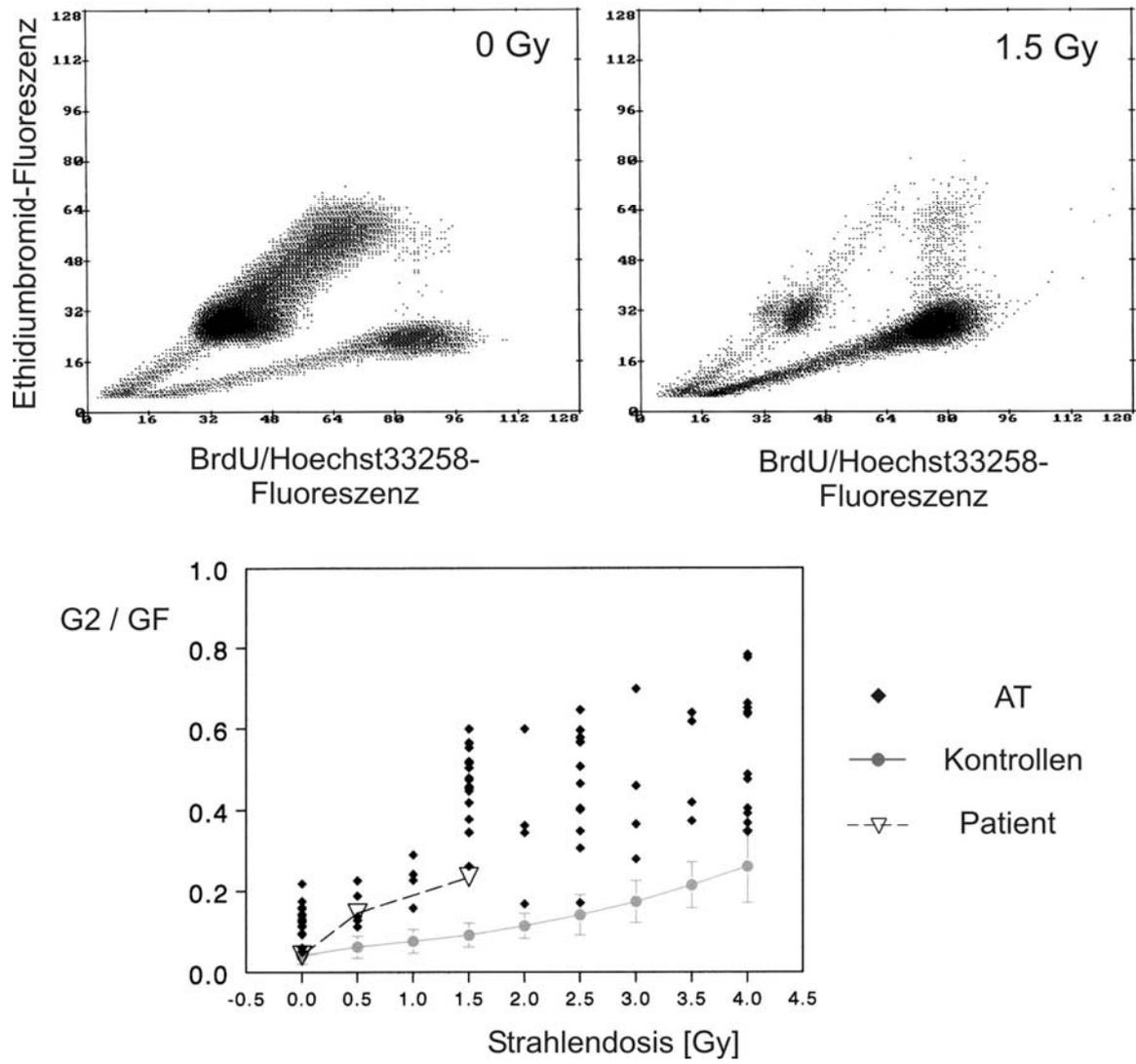


Abb. III/22b Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

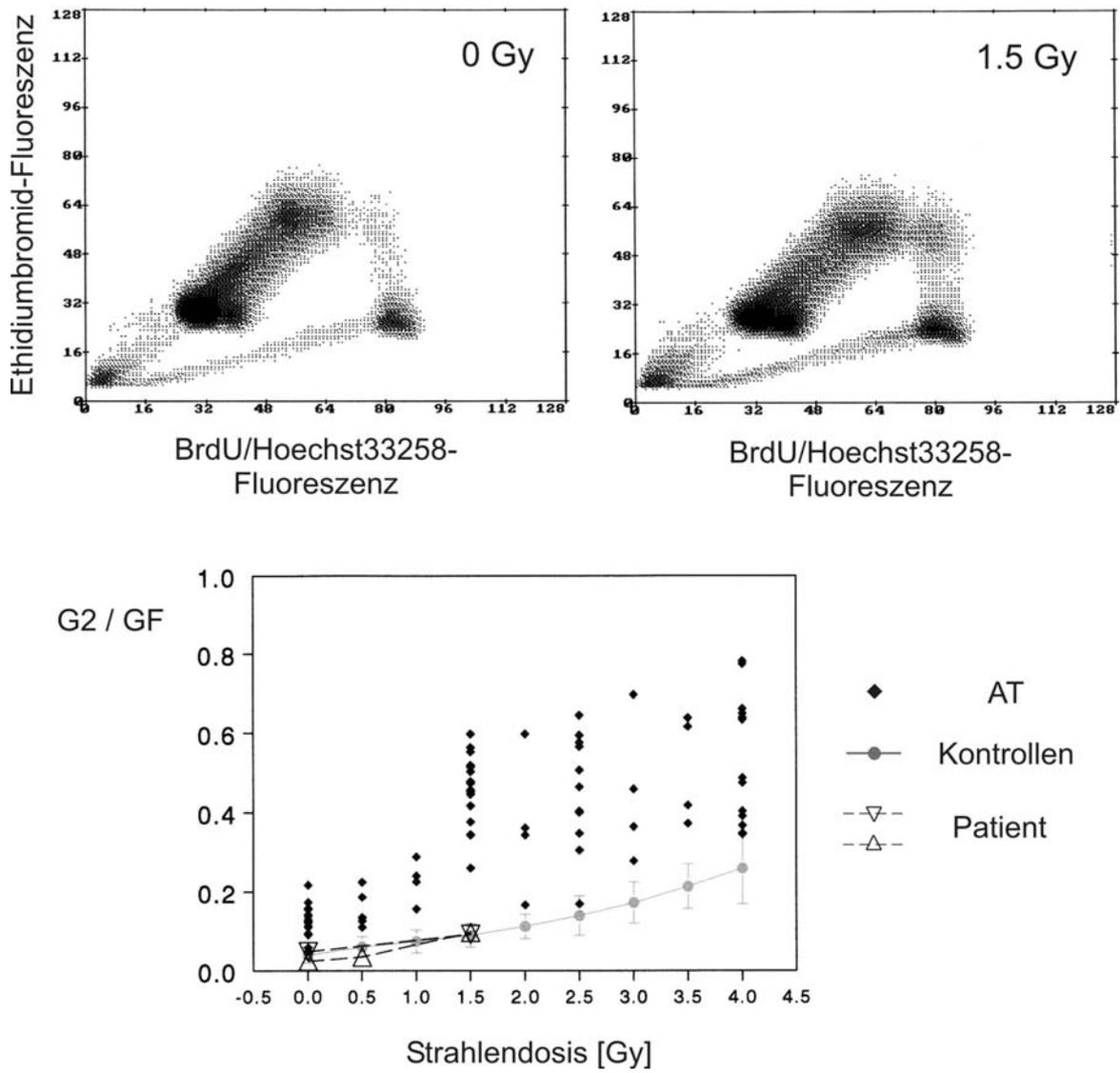


Abb. III/22c Zellzyklusanalyse (oben) sowie Abhängigkeit von G2/GF von der Bestrahlungsdosis (unten).

## 4 Diskussion

### 4.1 Diagnostische Parameter und Diagnose-Verfahren bei AT

Die Diagnose Ataxia telangiectasia basiert auf mehreren Parametern. Neben dem klinischen Bild (Ataxie, Dysarthrie, okuläre Apraxie; Teleangiektasien; gehäufte sinopulmonale Infektionen; im höheren Alter Entwicklung von Malignomen), welches in der Regel bei älteren Patienten (> 5 J.) den Verdacht AT erst begründet, spielt v.a. bei jüngeren Kindern die Labordiagnostik eine bedeutende Rolle. Wichtige Befunde sind hierbei:

- erhöhter AFP-Wert
- erniedrigte Spiegel von Immunglobulinen (IgG, IgE und IgA) sowie verminderte Zellzahl an B- und/oder T-Lymphozyten [Nowak-Wegrzyn et al. 2004]
- Chromosomenaberrationen und –translokationen, insbesondere unter Beteiligung der Chromosomen 7 und 14 [Koijs et al. 1991]
- Mutationen im ATM-Gen
- erniedrigtes oder fehlendes ATM-Protein (Immunoblot), welches je nach zugrundeliegender Mutation z.T. eine Restfunktion aufweisen kann, z.T. funktionslos ist (Funktionstest: Phosphorylierung von p53 an Serin 15)
- Strahlensensibilität von AT-Zellen *in vivo* und *in vitro*

Hinsichtlich der Aussagekraft der verschiedenen Befunde und Untersuchungsmethoden gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Über eine Erhöhung des AFP-Wertes wird bei 90-95% der Patienten berichtet [Perlman et al. 2003, Gatti 2002]. Aufgrund der Größe des ATM-Gens (66 Exons) und der großen Zahl unterschiedlicher Mutationen ist die direkte Sequenzierung bislang – auch hinsichtlich der hohen Kosten – kein etabliertes Routineverfahren. Zur Aufdeckung von Mutationen des ATM-Gens beim Patienten werden vielmehr zunächst unterschiedliche Screening-Verfahren eingesetzt und dann bei Auffälligkeiten nur die betreffenden Regionen sequenziert. Als Screening-Methoden stehen z. B. zur Verfügung: PTT (protein truncation test) [Telatar et al. 1996], SSCP (single-strand conformational polymorphism) [Buzin et al. 2002] und dHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) [Thorstenson et al. 2001]. Die Erfolgsrate bei der Entdeckung von Mutationen ist von der Art der verwendeten Screening-Methode abhängig. Für die Kombination verschiedener Methoden (STR (= short tandem repeat)-Haplotyp-Analyse, PTT, SSCP, dHPLC) wird eine Effizienz von 95% entdeckter Mutationen berichtet [Mitui et al. 2003]. Die Analyse des ATM-Proteins (Western-Blot) bei Patienten mit der

Verdachtsdiagnose AT ergibt in 85% der Fälle das Fehlen des Proteins, in 15% der Fälle werden reduzierte bis normale Protein-Spiegel gefunden [Becker-Catania et al. 2000]. Durch Verwendung von Kernlysaten anstelle von Ganzzell-Lysaten sowie einen zusätzlichen ATM-Protein-Funktionstest (Kinase-Aktivität) soll eine Steigerung der Sensitivität sowie Spezifität möglich sein [Chun et al. 2003]. Eine Einschränkung der Anwendungsfreundlichkeit dieser Methode ergibt sich aus der Tatsache, dass aufgrund der geringen Expression des ATM-Proteins in peripheren Blutzellen die Anlage einer lymphoblastoiden Zelllinie erforderlich ist. Überdies kann im Falle von Missense-Mutationen des ATM-Gens der Proteingehalt von Zellen unverändert, die Proteinfunktion jedoch eingeschränkt sein [Stewart et al. 2001]. Die Radiosensitivität von AT-Zellen wurde schon früh beschrieben [Taylor et al. 1975], tatsächlich bildete das Auslösen lebensbedrohlicher Komplikationen mit Todesfolge bei der Strahlentherapie eines Lymphoms die erste *in vivo*-Beobachtung dieser Eigenschaft [Gotoff et al. 1967]. Die Radiosensitivität von AT-Zellen beruht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung und kann sowohl an Fibroblasten wie Lymphozyten beobachtet werden kann. Zur klinischen Diagnostik der Strahlenempfindlichkeit wurde 1994 eine Methode vorgestellt, die das Überleben bestrahlter Kulturen lymphoblastoider Zellen quantifiziert, der „colony survival assay“ (CSA) [Huo et al. 1994]. Hierbei werden ein normaler Bereich (Überleben eines Zellanteils von >36%), ein nicht-diagnostischer Zwischenbereich (21%–36%) sowie ein diagnostischer Bereich (<21%), der die für AT-Patienten charakteristische Region markiert, unterschieden [Sun et al. 2002]. Der diagnostische Wert dieses Ansatz wird mit einer Sensitivität von >99% und einer Spezifität von >92% beziffert [Sun et al. 2002]; letztere wird an anderer Stelle jedoch mit lediglich 73% angegeben [Chun et al. 2003]. Ebenso wie die ATM-Protein-Analyse ist auch der CSA auf die Präparation einer lymphoblastoiden Zelllinie angewiesen, der erforderliche Zeitaufwand für eine Diagnosefindung auf diesem Weg wird mit etwa 3 Monaten angegeben [Sun et al. 2002].

## 4.2 Zellzyklusdiagnostik bei AT

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Zellzyklusanalyse von mononukleären Zellen des peripheren Bluts. Betrachtet wird hierbei der Anteil der nach Mitogen-Stimulation proliferierenden bzw. nicht-proliferierenden Zellen (G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>) sowie der Anteil der in der G<sub>2</sub>-Phase des 1. Zellzyklus verbleibenden Zellen bezogen auf die Wachstumsfraktion (G<sub>2</sub>/GF). Diese Werte wurden sowohl ohne Bestrahlung der Lymphozyten als auch nach Einwirkung

unterschiedlicher Strahlendosen (0–4 Gy) bestimmt. Die Auftragung der bei einer Bestrahlungsdosis von 1.5 Gy gewonnenen Werte  $G_0, G_1$  gegen  $G_2/GF$  erlaubt eine gute Abgrenzung der strahlensensitiven gegen strahlenunempfindliche Zellen. Wie die erhaltenen Ergebnisse nahelegen, lässt sich eine Grenze zwischen beiden Gruppen bei einem Wert von  $G_2/GF = 0.2$  ziehen; Proben unterhalb dieses Wertes sind als strahlenunempfindlich, solche, die oberhalb liegen, als strahlensensitiv anzusehen. Wie einige der in Kap. 3.1 besprochenen Fälle zeigen, gibt es in dieser Region ( $G_2/GF = 0.2$ ) einen Grenzbereich der Strahlenempfindlichkeit.

#### *Grenzwertige Strahlensensitivität bei erhöhtem AFP-Wert*

So liegt beispielsweise Fall 5 mit einem Wert von  $G_2/GF = 0.182^a$  formal unterhalb der oben definierten Grenze. In der zweidimensionalen Auftragung ergibt hier jedoch die stark unterdurchschnittliche Zellproliferation unter Bestrahlung ( $G_0, G_1 = 93.5\%^a$ ) schon eine deutliche Trennung vom Cluster der AT-negativen Fälle. Unter Berücksichtigung des erhöhten AFP-Wertes (171.1 ng/ml) wird diese Trennung noch deutlicher (vgl. dreidimensionale Auftragung in Abb. 4.2). Ähnliches gilt für den Fall 12, bei dem eine ebenfalls grenzwertige Strahlensensitivität ( $G_2/GF = 0.217$ ), bei unterdurchschnittlicher Stimulierbarkeit der bestrahlten Zellen ( $G_0, G_1 = 51.6\%$ ) und erhöhtem AFP-Wert (115.4 ng/ml) vorliegt.

In beiden Fällen konnte die auf der Grundlage der Zellzyklusanalyse gestellte Diagnose AT durch eine Mutationsanalyse des ATM-Gens bestätigt werden. Im Fall 5 erwies sich der Patient als homozygot für die Veränderung  $4909+1g \rightarrow a$ , die zu aberrantem Spleißen und Fehlen der Sequenz von Exon 34 in der cDNA führt. Im Fall 12 zeigte sich, dass der Betroffene compound-heterozygot für zwei unterschiedliche Mutationen war. Zum einen fand sich in Exon 32 die Mutation  $4587T > G$ , eine Nonsense-Mutation, die zum Abbruch der Proteinsynthese führt. Als zweite Veränderung ließ sich die Mutation  $538C > T$ , ebenfalls eine Nonsense-Mutation identifizieren.

#### *Grenzwertige Strahlensensitivität bei unauffälligem AFP-Wert*

Schwieriger gestaltet sich eine Interpretation der Ergebnisse, wenn bei einer grenzwertigen Strahlensensitivität ein normaler AFP-Wert ( $<4$  ng/ml) gefunden wird (Fall 17). Die Zellzyklusanalyse wurde hier wiederholt durchgeführt. Bei der 1. Untersuchung wurde ein Wert von  $G_2/GF = 0.193$ , bei der 2. Untersuchung von  $G_2/GF = 0.148$  gefunden; die Lymphozyten zeigten bei beiden Untersuchungen eine unterdurchschnittliche Stimulierbarkeit ( $G_0, G_1 = 37.0\%$

---

<sup>a</sup> Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die angegebenen Werte für  $G_0, G_1$  und  $G_2/GF$  auf eine Strahlendosis von 1.5 Gy.

bzw. 59.8%). Trotz der beobachteten geringen Strahlensensitivität erscheint wegen des normalen AFP-Wertes die Diagnose AT als unwahrscheinlich. Grundsätzlich ist in derartigen Fällen – unter Berücksichtigung des klinischen Bildes – auch an das Vorliegen eines anderen Strahlensensitivitätssyndroms zu denken, in Frage kommen hier die sogenannten „AT-ähnlichen Erkrankungen“ („AT-like disorders“, z.B. ein Defekt im MRE11-Gen [Stewart et al. 1999]) oder das Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) [The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group 2000]

### *Strahlensensitivität und Stimulierbarkeit der Zellen*

Insgesamt lässt sich aus der Summe der hier vorgestellten Untersuchungen ersehen, dass eine erhöhte Strahlensensitivität tendenziell mit einer verminderten Stimulierbarkeit der Lymphozyten einhergeht. Umgekehrt zeigen wenig strahlenempfindliche Zellen in der Regel eine bessere Proliferation. Es gibt jedoch durchaus Ausnahmen. So waren die Lymphozyten der Fälle 10 und 13 zwar gut stimulierbar (Fall 10: G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> = 27.2%; Fall 13: G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> = 24.3%), wiesen aber dennoch eine erhöhte Strahlensensitivität auf (Fall 10: G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> = 0.313, bei höheren Dosen stieg dieser Wert auf 0.632 (2.5 Gy) bzw. 0.762 (4.0 Gy); Fall 13: G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> = 0.494). In beiden Fällen konnte unter Berücksichtigung der klinischen Bildes und der erhöhten AFP-Werte (im Fall 10 nur schwach erhöht: 11.8 ng/ml; Fall 13: 122.2 ng/ml) die Diagnose AT verifiziert werden. Eine Mutationsanalyse ergab im Fall 10 eine Deletion von 159 bp, welche genau dem Exon 54 entspricht. Die Patientin erwies sich als heterozygot für diese Veränderung, eine weitere Mutation konnte bislang nicht identifiziert werden. Ferner sei noch auf einen Fall hingewiesen, bei dem eine scheinbare Strahlensensitivität bei gleichzeitig guter Stimulierbarkeit der Lymphozyten besteht (Fall 14). Auffällig ist hierbei das für die Verdachtsdiagnose AT ungewöhnlich hohe Alter von 62 Jahren. Auch der mit 4.1 ng/ml normale AFP-Wert steht zu dieser Verdachtsdiagnose im Widerspruch. Bei der Beurteilung der Zellzyklusanalyse ist zu berücksichtigen, dass der bei einer Dosis von 1.5 Gy für die Strahlensensitivität erhaltene Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> = 0.235 vor dem Hintergrund einer bereits spontan bestehenden Blockierung der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des 1. Zellzyklus zu sehen ist (vgl. Abb. III/14b). Der entsprechende Wert G<sub>2</sub>/G<sub>F</sub> = 0.176 (ohne Bestrahlung) ist demnach unter Berücksichtigung der weiteren Befunde weniger Hinweis auf das Krankheitsbild AT als vielmehr Zeichen einer offenbar insgesamt bestehenden genomischen Instabilität.

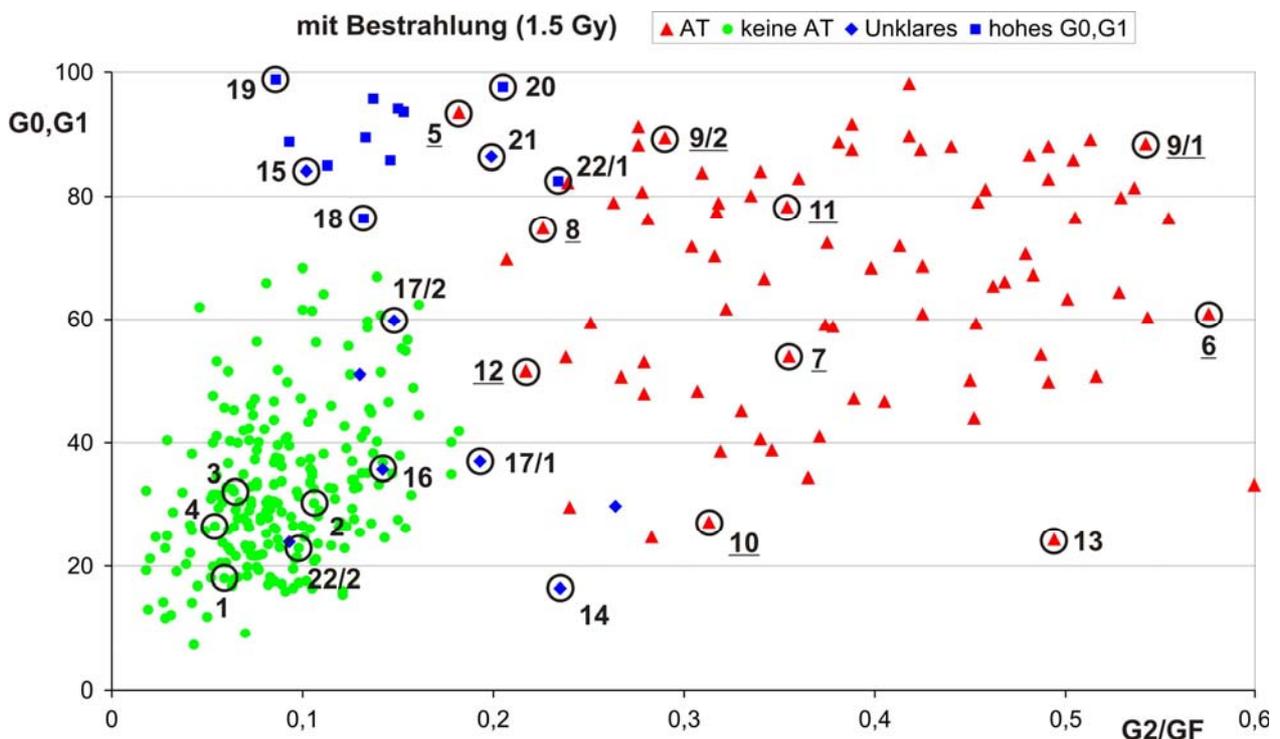
Grenzfälle in anderer Hinsicht stellen die Beispiele mit stark unterdurchschnittlicher Zellproliferation bei niedriger Strahlenempfindlichkeit. Hierbei kann es sich zum einen um AT-Fälle handeln, wie das Beispiel 15 zeigt. Wegweisend sind der erhöhte AFP-Wert sowie die

erhöhte Strahlensensibilität bei höheren Bestrahlungsdosen (vgl. Abb. III/15b). Zum anderen finden sich in dieser Kategorie Fälle, die in der Zellzyklusanalyse einen starken Zellzerfall zeigen. Dieser kann technische Gründe haben (z.B. geronnenes Blut; Fall 22; die Nachuntersuchung ergab unauffällige Werte) oder auf biologischen Ursachen beruhen, z.B. der T-Zell-Defekt im Fall 19 oder das im Falle 21 bestehende Lymphom. Auch im Falle einer Leukämie (Fall 20) kann ein durch die Erkrankung bedingtes verändertes Verhalten der Lymphozyten die Auswertung der Zellzyklusdaten erschweren bis unmöglich machen.

### 4.3 Schlussfolgerungen

#### 4.3.1 Konkordanz zwischen durchflusszytometrischer und molekulargenetischer Analyse

Abb. 4.1 zeigt eine Übersicht der im Rahmen der vorliegenden Arbeit behandelten Fälle. Es wurde versucht, durch die Auswahl der Fälle einen möglichst repräsentativen Querschnitt durch die Gesamtmenge der durchgeführten Untersuchungen zu geben.



**Abb. 4.1** Übersicht über die behandelten Fälle: Auftragung des Prozentsatzes nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen die Strahlensensibilität (G2/GF). Unterstrichung (z. B. 5) weist auf zusätzliche Bestätigung der Diagnose AT durch eine Mutationsanalyse des ATM-Gens hin.

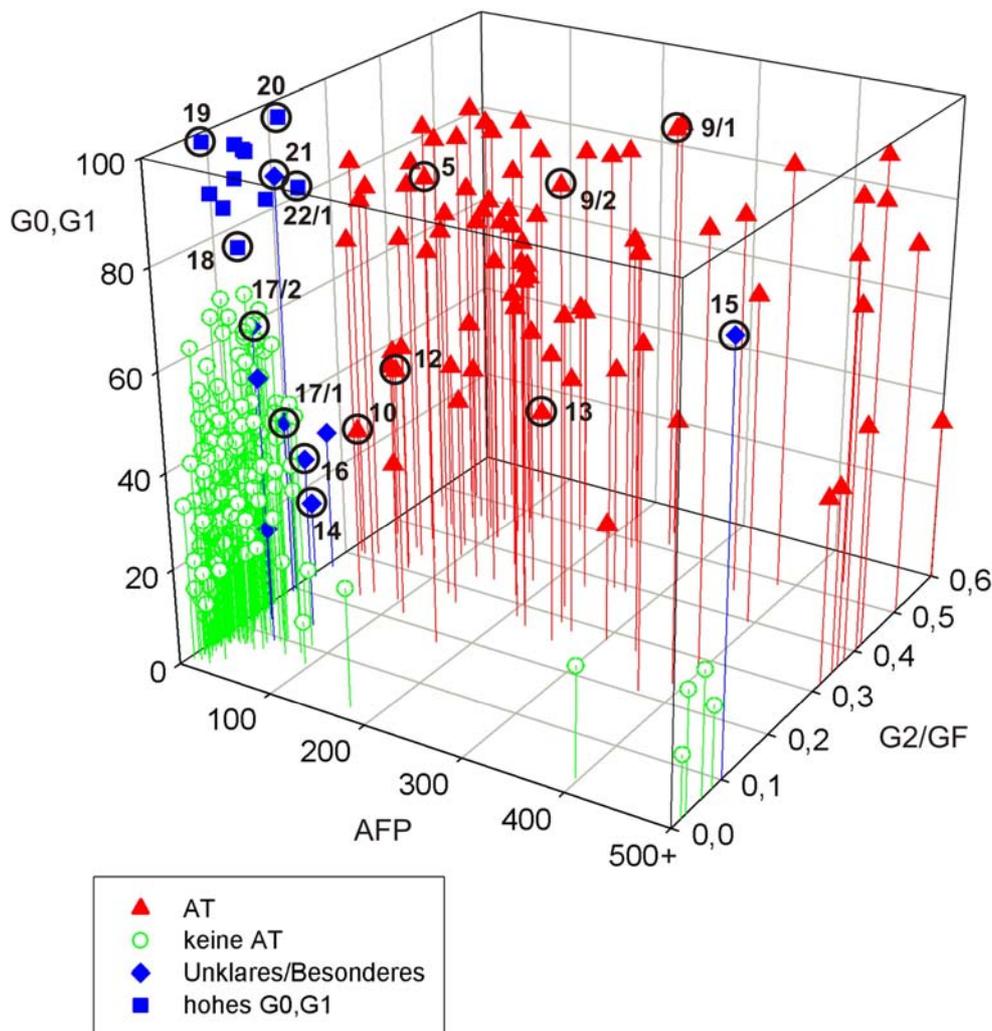
Unter den AT-Fällen wurden insbesondere diejenigen ausgesucht, die auf zellulärer Ebene unterschiedliche Subkategorien (stark strahlenempfindliche Zellen/mäßig strahlenempfindliche Zellen, geringe Zellproliferation/mäßig-gute Zellproliferation) der Erkrankung repräsentieren und bei denen die Diagnose AT zusätzlich durch eine Mutationsanalyse des ATM-Gens verifiziert wurde. Somit ist in diesen Fällen der durchflusszytometrische Hinweis auf das Vorliegen einer AT durch die Mutationsanalyse bestätigt. Die große Streubreite dieser molekulargenetisch gesicherten AT-Fälle (vgl. Abb.4.1) verdeutlicht, dass sowohl Strahlensensitivität als auch Mitogen-Antwort bei AT-Patienten sehr heterogen sein können. Daraus ergibt sich die interessante Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen individuellem Krankheitsverlauf und Grad der Radiosensitivität bzw. der proliferativen Kapazität der getesteten mononukleären Blutzellen. Die Beantwortung dieser Frage würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen und bleibt daher zukünftigen Analysen vorbehalten.

#### **4.3.2 Optimierung der Diagnostik durch 3-Parameter-Analyse**

Die in Abb. 4.1 gezeigte zweiparametrische Auftragung des Anteils der nicht-proliferierenden Zellen (G0,G1) gegen den Anteil der in der G2-Phase des 1. Zellzyklus verbleibenden Zellen bezogen auf die Wachstumsfraktion (G2/GF) führt hierbei bereits zu einer guten Abgrenzung der AT-positiven gegen AT-negative Fälle. Dennoch ergeben sich Grenzfälle, bei denen, wie oben ausgeführt, relativ geringe Strahlensensitivitäten und/oder eine schlechte Zellproliferation nach Mitogen-Stimulation beobachtet wurden. Im Vergleich zur zweidimensionalen Darstellung der Messdaten in Abbildung 4.1 kommt es durch die Hinzunahme eines dritten Parameters (des AFP-Wertes) zu einer noch besseren Diskrimination zwischen AT-positiven und AT-negativen Fällen (vgl. Abbildung 4.2). Diese Verbesserung geht vor allem darauf zurück, dass AT-negative Patienten, mit Ausnahme Neugeborener, in der Regel einen niedrigen AFP-Wert aufweisen. Der einheitlich niedrige AFP-Wert der AT-negativen Patienten kondensiert den entsprechenden Cluster in der dreidimensionalen Darstellung. Gleichzeitig führt der typischerweise erhöhte AFP-Wert der AT-positiven Fälle zu einer verbesserten Separierung der AT-positiven und AT-negativen Cluster. Auch die unklaren Fälle, insbesondere die mit sehr hohen G0,G1-Phasenwerten erscheinen in der dreidimensionalen Darstellung besser abgegrenzt, bzw. lassen sich in der überwiegenden Zahl der Fälle mit Hilfe der Zusatzinformation AFP-Wert einer der beiden Gruppen (AT-negativ/AT-positiv) zuordnen. In Abb. 4.2 sind die betreffenden, in Kap. 3.2 näher besprochenen Fälle markiert, um einen Vergleich mit der Abb. 4.1 zu ermöglichen. So kann etwa

in den Fällen einer grenzwertigen Strahlensensitivität die Berücksichtigung des Parameters AFP-Wert einerseits eine Verschiebung in den „AT-typischen Bereich“ zur Folge haben (Fall 15), andererseits eine sich in der zweidimensionalen Auftragung scheinbar ergebene Zugehörigkeit zur Gruppe der AT-positiven Fälle korrigieren (Fall 14; vgl. jeweils Abb. 4.1 und Abb. 4.2).

Als Fazit des Vergleichs zwischen zwei- und dreidimensionaler Darstellung bleibt festzuhalten, dass die beste Trennschärfe zwischen AT-positiven und AT-negativen Fällen durch die gleichzeitige Bestimmung der G2/GF-Fraktion (Strahlensensitivität), der G0,G1-Fraktion (Mitogenantwort) sowie des AFP-Wertes erreicht werden kann.



**Abb. 4.2** Dreidimensionale Auftragung des Prozentsatzes nicht-proliferierender Zellen (G0,G1) gegen Strahlensensitivität (G2/GF) und AFP-Wert mit Kennzeichnung besonderer Fälle.

### 4.3.3 Vergleich mit anderen Diagnoseverfahren

Der Vorteil der hier beschriebenen Methode der Radiosensitivitätsbestimmung mittels Zellzyklusanalyse gegenüber anderen Methoden wie etwa dem Colony Survival Assay (CSA) besteht:

a) in der Möglichkeit, periphere Blutzellen (Lymphozyten) verwenden zu können und  
b) in der hierdurch bedingten deutlich schnelleren Diagnostik, die es erlaubt, schon etwa 7–10 Tage nach Blutentnahme eine Aussage über ein etwaiges Vorliegen der Erkrankung zu treffen.

Im Gegensatz dazu beträgt diese Zeitspanne im Falle des CSA etwa 3 Monate [Sun et al. 2002], bedingt durch die bei dieser Methode erforderliche Transformation von Lymphozyten zu lymphoblastoiden Zellen. Diese Transformation ist auch für die AT-Testung auf Proteinebene durch den Westernblot erforderlich, da die ATM-Expression in nativen Blutzellen zu gering ist. Darüberhinaus ergibt der Western-Blot nur in ca. 85% der Fälle einen eindeutigen Befund (Fehlen bzw. Veränderung des ATM-spezifischen Signals).

Die durch die Verwendung von Lymphozyten mögliche raschere Diagnostik bietet zudem insbesondere im Hinblick auf eine in bestimmten Fällen angestrebte pränatale Diagnostik Vorteile. Als Screening-Methode ist dieses Verfahren allen anderen eindeutig überlegen. Der entscheidende Vorzug der hier vorgestellten Diagnostik-Methode besteht in dem geringen Zeit- und Arbeits-Aufwand. Diese Vorteile sind in der klinischen Praxis von entscheidender Bedeutung, denn sie gestatten nicht nur den schnellen Ausschluss bzw. die schnelle Bestätigung der Verdachtsdiagnose AT, sondern sie erlauben auch eine relativ großzügige Indikationsstellung zur Laboruntersuchung im Rahmen der Differentialdiagnostik ataktischer Störungen des Kindesalters. Je nach Erfahrung der überweisenden Kliniker beträgt der Anteil der durch das hier vorgestellte Verfahren als positiv diagnostizierten Fälle zwischen 5 und 20%. D.h. die große Mehrheit der getesteten Patienten ergibt ein negatives Ergebnis, für die der Aufwand der Testung durch CSA oder Western-Blot kaum zu rechtfertigen wäre. Das gleiche gilt für die direkte Mutationsanalyse des ATM-Gens. Ähnlich problematisch ist auch die zu diagnostischen Zwecken durchgeführte cytogenetische Untersuchung von Lymphozyten auf Chromosomenalterationen. Es ist bekannt, dass bei AT-Patienten insbesondere Translokationen und Inversionen der Chromosomen 7 und 14 auftreten. Dies ist zwar ein charakteristischer, jedoch nicht für diese Erkrankung spezifischer Befund, da derartige Veränderungen generell die am häufigsten beobachteten chromosomalen Veränderungen auch von Lymphozyten phänotypisch gesunder Individuen sind [Kojis et al.1991]. Erschwert wird die cytogenetische Untersuchung noch durch den Umstand der schlechten Stimulierbarkeit von AT-Lymphozyten, wodurch die Analyse einer für eine fundierte diagnostische Aussage hinreichenden Zahl von Metaphasen in manchen Fällen undurchführbar wird.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse von Lymphozyten bei Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia beschrieben. Hierzu wurden die Daten von 327 Patienten ausgewertet. In 82 Fällen ergab sich eine Bestätigung der Verdachtsdiagnose, in 225 Fällen konnte das Vorliegen dieser Erkrankung ausgeschlossen werden, bei den übrigen untersuchten Fällen ergab die Zellzyklusanalyse Auffälligkeiten hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der untersuchten Zellen und/oder ihrer Strahlensensitivität, die eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Gruppen (AT-positiv/AT-negativ) zunächst nicht gestatteten. Diese Auffälligkeiten lassen sich teils auf technische Probleme (geronnenes Blut, langer Zeitraum zwischen Blutentnahme und Analyse), teils auf biologische Besonderheiten (bestehende Begleiterkrankungen wie Leukämie, Lymphom) zurückführen. Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von Lymphozyten ergibt als diagnostisch relevante Parameter den Anteil der nicht-proliferierenden Zellen (G0,G1) sowie den Anteil der in der G2-Phase des 1. Zellzyklus verbleibenden Zellen bezogen auf die Wachstumsfraktion (G2/GF). Der Anteil der nicht-proliferierenden Zellen (G0,G1) ist ein Maß für die Stimulierbarkeit der Lymphozyten. Diese Stimulierbarkeit ist bei Zellen von AT-Patienten häufig vermindert, d.h. das Ausmaß der Mitogenantwort gibt ebenso einen Hinweis auf das Vorliegen der Erkrankung AT wie die Strahlensensitivität der Zellen. Letztere wird durch den zweiten der oben angeführten Parameter (G2/GF) repräsentiert. Der für die Erkrankung AT charakteristische Funktionsverlust des ATM-Proteins, welches im unbeeinträchtigten Zustand für die Kontrolle der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schädigungen verantwortlich ist, führt typischerweise zu einer Erhöhung des Anteils von Zellen in der G2-Phase, nachdem diese Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt waren.

Die zweidimensionale Auftragung dieser Parameter (G0,G1 gegen G2/GF) erlaubt in der Regel bereits eine guten Abgrenzung der Gruppe der AT-positiven gegen die AT-negativen Fälle. Die Berücksichtigung eines weiteren Parameters, nämlich des AFP-Wertes, gestattet darüberhinaus in mehreren Fällen die Zuordnung der oben erwähnten, zunächst unklaren Fälle zu einer dieser Gruppen. Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von bestrahlten Lymphozyten kann daher als Screening-Methode bei der Untersuchung von Patienten mit der Verdachtsdiagnose Ataxia telangiectasia als ein dem CSA überlegenes Verfahren angesehen werden. Die Kombination dreier Parameter:

- 1) Anteil der nicht-proliferierenden Zellen (G0,G1),

2) Anteil der in der G2-Phase des 1. Zellzyklus verbleibenden Zellen bezogen auf die Wachstumsfraktion (G2/GF) und

3) AFP-Wert

erlaubt hierbei im Rahmen der AT-Diagnostik in >93% der Fälle eine eindeutige Zuordnung zur Gruppe der AT-negativen bzw. AT-positiven Fälle.

## 6 Literatur

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Hrsg.), *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- Bakkenist CJ, Kastan MB, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature* 421 (2003) 499–506.
- Ball D, Rose E, Alpert E, Alpha-fetoprotein levels in normal adults, *Am. J. Med. Sci.* 303 (1992) 157–159.
- Beamish H, Lavin MF, Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay, *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1994) 175–184.
- Becker-Catania SG, Chen G, Hwang M, Wang Z, Sun X, Sanal O, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Chessa L, Lee EY, Gatti RA, Ataxia–telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity, *Mol. Genet. Metabol.* 70 (2000) 122–133.
- Blohm ME, Vesterling-Hörner D, Calaminus G, Göbel U, Alpha<sub>1</sub>-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age, *Pediatr. Hematol. Oncol.* 15 (1998) 135–142.
- Buzin CH, Gatti RA, Nguyen VQ, Wen CY, Mitui M, Sanal O, Chen JS, Nozari G, Mengos A, Li X, Fujimura F, Sommer SS, Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S, *Hum. Mutat.* 21 (2003) 123–131.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B, Mechanisms of human DNA repair: an update, *Toxicology* 193 (2003) 3–34.
- Chun HH, Sun X, Nahas SA, Teraoka S, Lai C-H, Concannon P, Gatti RA, Improved diagnostic testing for ataxia–telangiectasia by immunoblotting of nuclear lysates for ATM protein expression, *Mol. Gen. Met.* 80 (2003) 437–443.
- Gatti RA, Ataxia–Telangiectasia, in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hrsg.), *The metabolic and molecular basis for inherited disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, S. 705–732.
- Gatti RA, The inherited basis of human radiosensitivity, *Acta Oncol.* 40 (2001) 702–711.
- Gatti RA, Ataxia–Telangiectasia, in: Vogelstein B, Kinzler KW (Hrsg.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, 2002, S. 239–266.
- Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ, Ataxia telangiectasia – Neoplasia, untoward response to X-irradiation, and tuberous sclerosis, *Am. J. Dis. Child.* 114 (1967) 617–25.
- Greenberg F, Rose E, Alpert E, Hereditary persistence of alpha-fetoprotein, *Gastroenterology* 98 (1990) 1083–1085.
- Huo YK, Wang, Hong J-H, Chessa L, McBride WH, Perlman SL, Gatti RA, Radiosensitivity of ataxia–telangiectasia, X-linked agammaglobulinemia and related syndromes using a modified colony survival assay, *Cancer Res.* 54 (1994) 2544–2547.

- Kastan MB, Lim D, The many substrates and functions of ATM, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1 (2000) 179–186.
- Kojis TL, Gatti RA, Sparkes RS, The cytogenetics of ataxia telangiectasia, *Cancer Genet. Cytogenet.* 56 (1991) 143–156.
- McConville CM, Stankovic T, Byrd PJ, McGuire GM, Yao QY, Lennox GG, Taylor AMR, Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 320–330.
- Mitui M, Campbell C, Coutinho G, Sun X, Lai C-H, Thorstenson Y, Castellvi-Bel S, Fernandez L, Monros E, Carvalho BTC, Porras O, Fontan G, Gatti RA, Independent mutational events are rare in the ATM gene: haplotype prescreening enhances mutation detection rate, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 43–50.
- Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM, Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia, *J. Pediatr.* 144 (2004) 505–511.
- Oppitz U, Bernthaler U, Schindler D, Soback A, Hoehn H, Platzer M, Rosenthal A, Flentje M. Sequence analysis of the ATM gene in 20 patients with RTOG grade 3 or 4 acute and/or late tissue radiation side effects, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 44 (1999) 981–988.
- Perlman S, Becker-Catania S, Gatti RA, Ataxia-Telangiectasia: diagnosis and treatment, *Semin. Pediatr. Neurol.* 10 (2003) 173–182.
- Platzer M, Rotman G, Bauer D, Uziel T, Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Shiloh Y, Rosenthal A, Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene, *Genome Res.* 7 (1997) 592–605.
- Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dork T, Bendix R, Skawran B, Stuhmann M, Wegner RD, Sperling K, Banin S, Shiloh Y, Baumer A, Bernthaler U, Sennfelder H, Brohm M, Weber BH, Schindler D, Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 69–79.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali RP, Simmons A, Clines GC, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NGJ, Taylor AMR, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science* 268 (1995) 1749–1753.
- Scott D, Spreadborough AR, Roberts SA, Radiation-induced G<sub>2</sub> delay and spontaneous chromosome aberrations in ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes, *Int. J. Radiat. Biol.* 65 (1994) 175–184.
- Schindler D, Soback A, Diagnostik von Ataxia telangiectasia mittels Durchflußzytometrie und Zellzyklusanalyse, in: Stuhmann M, Dörk T, Karstens JH (Hrsg.), Ataxia telangiectasia, medizinischegenetik edition, München, 1999, S. 11–16.
- Schindler D, Hoehn H, Flow cytometric testing for syndromes with chromosomal instability, in: Wegner RD (Hrsg.), Diagnostic cytogenetics, Springer, Berlin Heidelberg, 1999, S. 269–281.

- Seyschab H, Schindler D, Friedl R, Barbi G, Boltshauser E, Fryns JP, Hanefeld F, Korinthenberg R, Krageloh-Mann I, Scheres JM, Schinzel A, Seemanová E, Tommerup N, Hoehn H, Simultaneous measurement, using flow cytometry, of radiosensitivity and defective mitogen response in ataxia telangiectasia and related syndromes, *Eur. J. Pediatr.* 151 (1992) 756–760.
- Shiloh Y, Ataxia telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: Related disorders but genes apart, *Annu. Rev. Gen.* 31 (1997) 635–662.
- Shiloh Y, ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 155–168.
- Shiloh Y, Andegeko Y, Tsarfaty I, In search of drug treatment for genetic defects in the DNA damage response: the example of ataxia-telangiectasia, *Semin. Cancer Biol.* 14 (2004) 295–305.
- Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AMR, ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 334–345.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM., The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder, *Cell* 99, (1999) 577–587.
- Stewart GS, Last JI, Stankovic T, Haites N, Kidd AM, Byrd PJ, Taylor AMR, Residual ataxia telangiectasia mutated protein function in cells from ataxia telangiectasia patients, with 5762ins137 and 7271T→G mutations, showing a less severe phenotype, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30133–30141.
- Sun X, Becker-Catania SG, Chun HH, Hwang M, Huo Y, Wang Z, Mitui M, Sanal O, Chessa L, Crandall B, Gatti RA, Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing, *J. Pediatr.* 140 (2002) 724–731.
- Tavani F, Zimmerman RA, Berry GT, Sullivan K, Gatti R, Bingham P, Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI, *Neuroradiology* 45 (2003) 315–319.
- Taylor AMR, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA, Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity, *Nature* 258 (1975) 427–429.
- Taylor AMR, Metcalfe JA, Thick J, Mak Y-F, Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia, *Blood* 87 (1996) 423–438.
- Telatar M, Wang Z, Udar N, Liang T, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Lavin M, Shiloh Y, Concannon P, Good RA, Gatti RA, Ataxia-telangiectasia: mutations in ATM cDNA detected by protein-truncation screening, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 40–44.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengut S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P, Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 1617–1631.

The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, Nijmegen breakage syndrome, *Arch. Dis. Child.* 82 (2000) 400–406.

Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, Chu G, Oefner PJ, Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 396–412.

Woods CG, Taylor AMR, Ataxia telangiectasia in the British isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals, *Q. J. Med. New Series* 298 (1992) 169–179.

## **Dank**

Herrn Prof. Dr. med. H. Höhn danke ich für seine jederzeit gewährte Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas, nicht zuletzt in Form von Naturalien bei gelegentlichen „Arbeits-Teerunden“.

Herrn Prof. Dr. med. D. Schindler möchte ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates danken und ihm und seinen Mitarbeitern, insbesondere Frau Benni Gottwald, Herrn Richard Friedl und Herrn Reinhard Kalb, außerdem für ihre Hilfs- und Auskunftsbereitschaft in allgemeinen und technischen Fragen (und nicht zuletzt für ihre engagierte Mitwirkung bei der Suche nach häufig zu Unrecht verschollen geglaubten Akten!).



## **Lebenslauf**

Name: Frank Tilman Heinrich  
Geburtsdatum: 24. Februar 1970  
Geburtsort: München

### ***Schule***

1976–1980 Besuch der Grundschule West in Bad Salzuflen  
1980–1989 Besuch des Friedrichsgymnasiums in Herford; Abitur

### ***Zivildienst***

1989–1990 Zivildienst bei den Medizinischen Einrichtungen der Universität  
Düsseldorf

### ***Hochschule***

1989–1990 Ausbildung zum nebenamtlichen Kirchenmusiker an der Hochschule für  
Kirchenmusik Herford (*C-Examen: 1990*)  
1990–1996 Studium der Chemie an der Universität Würzburg (*Diplom: 1996*)  
1996–2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg (*Physikum:  
1999; 1. Staatsexamen: 2001; 2. Staatsexamen: 2004; 3. Staatsexamen  
2005*)  
Promotionsstudium im Fach Anorganische Chemie  
(*Promotion zum Dr. rer. nat.: 2004*)  
Praktisches Jahr April 2004–März 2005  
*1. Terial:* Humangenetik, Institut für Humangenetik, Universität  
Würzburg  
*2. Terial:* Chirurgie, Kantonales Spital Grabs, Schweiz  
*3. Terial:* Innere Medizin, Abt. für Gastroenterologie, Medizinische  
Universitätsklinik Würzburg und Dept. of Haematology, Western General  
Hospital, Edinburgh, Schottland

### ***Berufstätigkeit***

1996 Studentische Hilfskraft am Institut für Anorganische Chemie  
1997–2000 sowie 2001–2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anorganische  
Chemie

