

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje

Strahlensensibilität von Fibroblasten und Lymphozyten bei  
Brustkrebspatientinnen. Vergleich des alkalischen Comet Assay mit  
der klinisch beobachteten Hautreaktion nach Bestrahlung.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Stephanie Schulte

aus Lennestadt

Würzburg, Juni 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit in vitro</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Zielsetzung</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Comet Assay</b>	<b>6</b>
1.3.1 Entwicklung der Methode	6
1.3.2 Durchführung der Methode	7
1.3.3 Bedeutung des Comet Assay	8
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Patienten</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Behandlung der Patienten</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Präparation der Zellen</b>	<b>13</b>
2.3.1 Lymphozyten	13
2.3.2 Fibroblasten	14
<b>2.4 Bestrahlung der Zellen</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Comet Assay</b>	<b>16</b>
<b>2.6 Analyse</b>	<b>19</b>
<b>2.7 Auswertung der Meßergebnisse/Statistik</b>	<b>19</b>
2.7.1 Statistik	20
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>22</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Fibroblasten</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Lymphozyten</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Vergleich von Fibroblasten und Lymphozyten</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Reproduzierbarkeit der Methode</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Vergleich von vor und nach Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten</b>	<b>47</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>51</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>53</b>

<b>7 ANHANG</b>	<b>61</b>
<b>7.1 Puffer und Lösungen für den Comet Assay</b>	<b>61</b>
<b>7.2 Material</b>	<b>62</b>
7.2.1 Chemikalien	62
7.2.2 Medien, Medienzusätze und Lösungen für die Zellkultur	62
7.2.3 Geräte	62
7.2.4 Glas- und Plastikmaterialien	63
<b>7.3 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>63</b>

## 1 Einleitung

Die Strahlentherapie stellt eine der wichtigsten Behandlungsformen onkologischer Erkrankungen dar. Ziel ist in den meisten Fällen die lokale Tumorkontrolle. Während und nach der Strahlenbehandlung von Malignompatienten werden klinisch sehr unterschiedlich starke Früh- und Spätnebenwirkungen an Normalgeweben im Bestrahlungsfeld beobachtet, selbst wenn Bestrahlungsart, Gesamtdosis und Fraktionierungsschema identisch sind. Die Bestrahlungsdosis richtet sich nicht nur nach der Dosis, die nötig ist, um den Tumor zu zerstören, sondern auch nach der Dosis, die vom Normalgewebe im Bestrahlungsfeld noch toleriert werden kann, ohne daß starke Nebenwirkungen auftreten. Die Toleranzdosis ist ein gemittelter Erfahrungswert. Auf diese Weise kommt es nur bei ca. 5% der Patienten zu überdurchschnittlichen und bei rund 1% zu starken radiogenen Akut- und/oder Spätnebenwirkungen. Für erhöhte Strahlenreaktionen macht man zum Teil externe Faktoren wie starkes Rauchen oder Alkoholabusus während der Therapie und intrinsische genetische Faktoren verantwortlich. Dies wird dadurch verdeutlicht, daß eine Reihe genetisch bedingter Syndrome bekannt sind, die mit erhöhter Strahlenempfindlichkeit einhergehen [Streffer C., 1997]:

- Ataxia telangiectatica (AT)
- Bloom-Syndrom
- Fanconi-Anämie
- Li-Fraumeni-Syndrom
- Nävoidbasalzellkarzinom-Syndrom
- Neurofibromatose
- Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS)
- Retinoblastom

Die erhöhte Radiosensitivität dieser Erkrankungen kann auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Bestrahlte Zellen von AT-Patienten zeigen z.B. vermehrt

Chromosomenaberrationen [Mitchell and Scott, 1997; Tchirkov et al., 1997] und eine verstärkte Induktion von Mikrokernen [Nachtrab et al., 1997; Scott et al., 1996]. Darüber hinaus sind initialer bzw. residualer DNS-Schaden erhöht und die Reparatur verlangsamt [Djuzenova et al., 1999].

Ursache der Erkrankung Ataxia telangiectatica ist ein Funktionsverlust des Proteins ATM (Ataxia telangiectatica mutated protein), dem eine Rolle in der Signaltransduktionskaskade zugeschrieben wird, die nach DNS-Schädigungen den Zellzyklus steuert [Savitsky et al., 1995; Shiloh et al., 1995].

Der Anteil AT-Heterozygoter an der Gesamtbevölkerung wird auf ca. 1% geschätzt [Swift et al., 1991]. Sie weisen auch eine Prädisposition zur Entwicklung von Tumorerkrankungen auf und die Inzidenz von heterozygoten Erbträgern des ATM-Gens unter Krebspatienten beträgt bis zu 10%, unter Brustkrebspatientinnen zwischen 3,8 und 8,8% [Swift et al., 1987,1991]. Daraus entwickelte sich die Hypothese, daß Malignompatienten mit starken radiogenen Nebenwirkungen heterozygot für AT sein könnten. In einer Untersuchung an einem Kollektiv von 18 Tumorpatienten mit ungewöhnlich starken Früh- oder Spätreaktionen nach Radiotherapie wurden jedoch keine Mutationen im ATM-Gen gefunden [Oppitz et al., 1998]. Auch von anderen Autoren wurden keine funktionellen Mutationen im ATM-Gen unter den von ihnen untersuchten strahlensensitiven Patienten festgestellt [Appleby et al., 1997 und Ramsey et al., 1998]. Die erhöhte Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Patienten läßt sich also nicht durch Veränderungen im ATM-Gen erklären. Demzufolge ist wahrscheinlich eine Mutation in einem oder mehreren anderen Genen für die erhöhte Normalgewebsreaktion nach Bestrahlung verantwortlich. Solange hierüber noch Unklarheit herrscht, sind Mutationsanalysen zur Detektion von Strahlenempfindlichkeit im Vorfeld einer Radiotherapie nicht Methode der Wahl.

Es erscheint statt dessen sinnvoll, Tests zu entwickeln, die in der Lage sind, die erhöhte Strahlensensitivität von Patienten auf zellulärer Ebene durch Messung des Strahlenschadens prätherapeutisch möglichst rasch zu erfassen. Dadurch könnten im klinischen Alltag Einzel- und Gesamtdosen in Abhängigkeit vom Testergebnis individuell verordnet werden. Wenn zu erwartende Strahlennebenwirkungen über prädiktive Tests sicher erkennbar wären, dann könnte die Dosis bei den weitaus zahlreicheren restlichen Patienten erhöht werden, da die gängigen

Bestrahlungsprotokolle die durchschnittliche Häufigkeit von Nebenwirkungen berücksichtigen. Gewünschtes Ziel wäre eine verbesserte Tumorkontrolle bei den nicht vermehrt radiosensitiven Patienten.

### **1.1 Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit in vitro**

Der Koloniebildungstest wurde häufig angewendet, um den Zusammenhang der Radiosensitivität von Fibroblasten und den klinisch zu beobachtenden Strahlennebenwirkungen zu untersuchen. Hierbei werden z.B. Fibroblasten mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und das klonogene Überleben gegen die Bestrahlungsdosis in Form einer Überlebenskurve aufgetragen. Mit dieser Methode konnte in einigen Studien ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten in vitro und der späten Normalgewebsreaktion von Tumorpatienten [Brock et al., 1995; Burnet et al., 1994; Geara et al., 1993; Johansen et al., 1994] gefunden werden, jedoch keine Korrelation zwischen der Reaktion von Fibroblasten nach Bestrahlung und akuten Nebenwirkungen der Patienten. Auch Begg et al. [1993] und Rudat et al. [1997] konnten in Versuchen mit Fibroblasten von Tumorpatienten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen zellulärer Strahlenempfindlichkeit und akuten Normalgewebsreaktionen beobachten.

Zur prädiktiven Testung auf mögliche Spätreaktionen nach Radiotherapie ist der Koloniebildungstest nicht geeignet, da es mehrere Wochen bis Monate dauert, bis die Testergebnisse vorliegen.

Zur Vorhersage der Strahlenempfindlichkeit bei Tumor- wie auch normalen Zellen wurden in den letzten Jahren zytogenetische Methoden eingesetzt. Zu diesen gehört der Mikronukleus-Test. Mikrokerne entstehen dadurch, daß ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente während einer mitotischen Zellteilung nicht in die neuen Zellkerne aufgenommen werden, sondern als Chromatinpartikel in der folgenden Interphase im Zytoplasma erscheinen [Streffer C., 1992]. Sie sind einerseits als Ausdruck einer genomischen Instabilität wie sie bei menschlichen Tumorzellen auftritt, andererseits als Folge eines Strahlenschadens zu sehen.

Tumorpatienten mit klinisch erhöhter Normalgewebsreaktion sowie homo- und heterozygote Erbträger für AT konnten mit Hilfe des Mikronukleus-Tests identifiziert werden. Zellen dieser Personen zeigten eine signifikant höhere Induktion von Mikrokernen nach Bestrahlung im Vergleich zu Tumorpatienten mit keinen oder geringen klinischen Strahlennebenwirkungen [Nachtrab et al., 1998].

Der Mikronukleus-Test ist offensichtlich in der Lage, eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit von Patienten zu erfassen. Zur Prädiktion der Radiosensitivität normaler Gewebe strebt man die Kombination mit einem oder mehreren weiteren Tests an, wie der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) oder dem Comet assay, Methoden zur Quantifizierung von DNS-Schaden. Strahlenempfindlichkeit kann hierbei durch verschiedene Parameter erfaßt werden - den initialen DNS-Schaden nach Bestrahlung, die Geschwindigkeit und Effizienz der Reparatur sowie den irreparablen Restschaden [Wurm et al., 1994].

Wie mehrere Untersuchungen mit Fibroblasten zeigen, besteht ein Zusammenhang zwischen irreparablen radiogenen DNS-Doppelstrangbrüchen (DSB), gemessen durch PFGE, GVGE (Graded Voltage Gelelektrophorese) oder neutralem Comet Assay, und der im Koloniebildungstest ermittelten Strahlenempfindlichkeit [Eastham et al., 1999; Kiltie et al., 1997; Zhou et al., 1998]. Zudem korreliert das Ausmaß der bei bestrahlten Fibroblasten mit PFGE bestimmten DSB mit den späten Normalgewebsreaktionen bei Brustkrebspatientinnen [Kiltie et al., 1999]. Dies verdeutlicht das prädiktive Potential der residualen DSB im Hinblick auf spät auftretende Strahlennebenwirkungen.

Auch der Comet Assay scheint ein günstiger Test zu sein, um eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zu erfassen und damit eine Aussage über mögliche Normalgewebsnebenwirkungen zu treffen. Bei Durchführung unter alkalischen Bedingungen werden eine Vielzahl von DNS-Schäden erfaßt, d.h. neben Doppel- vor allem Einzelstrangbrüche und alkali-labile Stellen.

Mit Hilfe dieses Tests kann anhand von peripheren Lymphozyten zwischen AT-Homo- bzw. Heterozygoten und gesunden Kontrollpersonen unterschieden werden. Zellen von Trägern des ATM- Gens zeigen einen erhöhten initialen bzw. residualen DNS-Schaden nach Bestrahlung sowie eine langsamere DNS-Reparatur [Djuzenova et al., 1999]. Damit erweist sich der Comet Assay als geeignete Methode zur Erfassung der erhöhten Strahlenempfindlichkeit von Personen mit einer genetischen Prädisposition wie der

Erkrankung Ataxia telangiectatica (AT). Dies gilt nicht nur für die homozygoten Erbträger des ATM-Gens, sondern auch für die heterozygoten, welche nicht ohne weiteres aufgrund phänotypischer Veränderungen erkannt werden können.

In einer anderen Arbeit ergibt der Vergleich von bestrahlten Lymphozyten eines AT-Homozygoten, eines Malignompatienten mit erhöhter Strahlenreaktion und zwei normalen Spendern bei Analyse im alkalischen Comet Assay einen erhöhten residualen DNS-Schaden nach Bestrahlung sowohl bei dem AT- als auch bei dem Tumorpatienten. Der AT-Homozygote zeigt zudem eine geringere Reparaturgeschwindigkeit im Vergleich zu den normalen Kontrollen [Streffler C., 1997]. Die Bedeutung des Restschadens für die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit normaler Gewebe verdeutlicht auch eine Untersuchung mit Lymphozyten von Brustkrebspatientinnen, bei der die klinisch beobachteten Normalgewebsreaktionen signifikant mit den im alkalischen Comet Assay gemessenen irreparablen DNS-Schäden korrelieren [Alapetite et al., 1999].

Einen erhöhten initialen DNS-Schaden und eine reduzierte Reparaturkapazität finden Oppitz et al. [1999] bei homozygoten Erbträgern des ATM-Gens im Vergleich zu gesunden Kontrollen, gemessen mit Fibroblasten im alkalischen Comet Assay. Darüber hinaus wird bei Malignompatienten mit auffälligen akuten Strahlennebenwirkungen eine signifikant verlangsamte Reparaturgeschwindigkeit festgestellt. Die hier untersuchten Patienten waren an verschiedenen Tumorarten erkrankt und wurden unterschiedlich behandelt.

## **1.2 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Studie ist, an einem homogenen Patientenkollektiv bestehend aus 30 Brustkrebspatientinnen mit Hilfe des alkalischen Comet Assay zu untersuchen, ob eine Korrelation besteht zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten und Lymphozyten in vitro und der akuten Normalgewebsreaktion der entsprechenden Patientinnen. Damit soll geprüft werden, ob die Methode zur Prädiktion der Radiosensitivität normaler Gewebe geeignet ist.



Durch Verwendung von Fibroblasten und Lymphozyten wird ein Vergleich dieser beiden Zellarten im Hinblick auf DNS-Schädigung und –Reparatur nach Bestrahlung angestrebt.

Zudem soll die Frage adressiert werden, ob die Strahlenempfindlichkeit von vor und nach Radiotherapie gewonnen Lymphozyten signifikant unterschiedlich ist.

### **1.3 Comet Assay**

#### **1.3.1 Entwicklung der Methode**

Ionisierende Strahlen interagieren auf vielerlei Art mit zellulärer DNA und verursachen unterschiedliche Läsionen – Einzelstrangbrüche (single strand breaks, SSB), Doppelstrangbrüche (DSB), DNS-DNS- und DNS-Protein-Crosslinks sowie Schädigung von Purin- und Pyrimidinbasen. Es gibt verschiedene biochemische Methoden, um strahleninduzierte DNS-Läsionen zu erfassen.

Die Detektion von DNS-Einzelstrangbrüchen wurde zuerst von Rydberg und Johanson [1978] beschrieben. Bestrahlte Zellen wurden in Agarose eingebettet, auf Objektträger aufgetragen und unter milden alkalischen Bedingungen lysiert, damit sich die DNS teilweise entknäuelte. Nach Neutralisation wurde mit Acridinorange gefärbt. Bei Bindung an Einzelstrangbrüche fluoreszierte der Farbstoff rot, bei Bindung an Doppelstrang-DNS grün. Mit Hilfe eines Photometers bestimmte man das Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz, welches das Verhältnis von Doppel- zu Einzelstrang-DNS und damit das Ausmaß der DNS-Schädigung wiedergibt.

Darauf aufbauend entwickelte Rydberg 1984 eine durchflußzytometrische Methode, bei der er die Zellen in Agarose eingebettete, alkalisch lysierte und dann färbte, bevor er die Fluoreszenz im Durchflußzytometer maß.

Um die Sensitivität des Tests zur Detektion von DNS-Schaden zu erhöhen, führten Östling und Johanson 1984 die Mikrogelelektrophorese ein. Die bestrahlten Zellen wurden hier in Agarose suspendiert, auf Objektträger aufgetragen und in einer Salz- und Detergentienlösung mit neutralem pH lysiert. Während der nachfolgenden Elektrophorese wanderten die negativ geladenen DNS-Endstücke und relaxierten DNS-Schlingen aus den Kernen im elektrischen Feld zur Anode hin. Nach Färbung mit einem

Fluoreszenzfarbstoff (Acridinorange) erschienen die geschädigten Zellkerne unter dem Mikroskop als „Kometen“ mit einem stark fluoreszierenden „Kopf“ und einem „Schweif“. Durch das Verhältnis von DNS im „Kopf“ zur DNS im „Schweif“ konnte das Ausmaß der Schädigung quantifiziert werden. Ungeschädigte Zellen bestehen aus einem intakten Kern ohne „Schweif“.

Mit dieser Versuchsmethodik detektierten Östling und Johanson ebenfalls vornehmlich Einzelstrangbrüche, die zur Entknäuelung der DNS-Moleküle führten. Dabei entstanden relaxierte Schlingen mit negativer Ladung, die im elektrischen Feld wandern konnten.

Während die Basisschritte gleich blieben, modifizierte man die Originalmethode fortlaufend, um Sensitivität und Zuverlässigkeit zu steigern. Man führte Lyse und Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durch [Singh et al., 1988; Olive et al., 1990], um neben Einzelstrangbrüchen vor allem alkali-labile Stellen zu erkennen, welche bei höherem pH ebenfalls zu Brüchen im DNS-Molekül führen. Doppelstrangbrüche machen hier nur etwa 5% des Gesamtschadens aus.

Wenn Lyse und Elektrophorese in neutralem Milieu stattfinden [Hu und Hill, 1996; Marples et al., 1998; Olive et al., 1991; Sarkaria et al., 1998], werden vor allem DNS-Doppelstrangbrüche detektiert, die als „biologisch relevante“ Läsionen nach Bestrahlung angesehen werden. Sie treten etwa 25- bis 40mal seltener auf als Einzelstrangbrüche, weshalb viel höhere Bestrahlungsdosen und eine extensivere Lyse nötig sind, um sie zu erzeugen. Die kleinste Dosis, bei der Doppelstrangbrüche noch detektiert werden können, liegt bei 5 Gy.

Auch die Originalmethode, die Östling und Johanson beschrieben, wurde in neutralem Milieu durchgeführt, wobei die applizierte Strahlendosis jedoch gering war. Damit wurden keine Doppelstrangbrüche erkannt, sondern Einzelstrangbrüche mit Entknäuelung des DNS-Moleküls.

### **1.3.2 Durchführung der Methode**

Zur Durchführung des Assays werden die Zellen in Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (low melting point – LMP – Agarose) suspendiert. Die Endkonzentration sollte 0.5 – 1% betragen. Es gibt zwei Arten von Gelen:

- a) das einlagige Gel und

b) das Sandwich-Gel, bei dem sich die Zellen in der mittleren von drei Lagen befinden. Nach der Präparation der Objektträger erfolgt die Lyse der eingebetteten Zellen, bei entweder alkalischen oder neutralem pH. Bei der alkalischen Lyse, die in der Literatur am häufigsten beschrieben wird, gibt man die Zellen in eine Salz- und Detergentienlösung mit einem pH von 10 bis über 12 für mindestens eine Stunde. Vor der Elektrophorese werden die Objektträger in alkalischer Elektrophorese-Lösung inkubiert, welche wenig Salz und keine Detergentien enthält und einen noch höheren pH aufweist ( $> 12.3$ ). Nach der Elektrophorese wäscht man die Objektträger und färbt mit einem fluoreszierenden Farbstoff, bevor man die Zellen auf DNA-Schädigung hin untersucht.

Während die Grundschriffe zur Durchführung des Comet Assays festgelegt sind, haben die meisten Laboratorien ihre eigenen Versionen entwickelt, die sich vor allem in Dauer und Durchführung der Elektrophorese sowie anschließender Färbung und Analyse unterscheiden [Fairbairn et al., 1995].

### **1.3.3 Bedeutung des Comet Assay**

Die Strahlenbiologie ist ein bedeutendes Anwendungsgebiet des Comet Assay. Mit Hilfe dieser Methode kann neben dem initialen radiogenen DNS-Schaden auch das Ausmaß der Reparatur auf Einzelzellniveau quantifiziert werden. Hierzu inkubiert man die Zellen nach Bestrahlung für eine festgelegte Zeit bei  $37^{\circ}\text{C}$  und gibt ihnen so die Gelegenheit, den Strahlenschaden zu reparieren und die Konformation ihrer DNS wiederherzustellen.

Ein korrektes Ergebnis ist u.a. dadurch gewährleistet, daß apoptotische und nekrotische Zellen gut diskriminiert und von der Analyse ausgeschlossen werden können.

Mit dem Comet Assay verfügt man über eine bequeme, schnelle und sensitive Methode, um DNS-Schäden nach Bestrahlung zu messen. Einzigartig ist die Detektion der Schädigung auf dem Niveau von Einzelzellen, womit die Heterogenität einer Zellpopulation hinsichtlich der Reaktion auf die Bestrahlung untersucht werden kann.

Nahezu jede eukaryotische Zelle kann im Comet Assay analysiert werden. Die erforderliche Zellzahl ist gering, so daß die Methode auch dann durchgeführt werden kann, wenn nur wenige Zellen zur Verfügung stehen.

Die Quantifizierung des DNS-Schadens erfolgt unabhängig vom Zellzyklus in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurde eine homogene Gruppe bestehend aus 30 Brustkrebspatientinnen mit Tumorstadium pT1 oder pT2 untersucht, die sich nach brusterhaltender Operation in den Jahren 1998 und 1999 in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg zur postoperativen Radiotherapie vorstellten (Tabelle 2.1). Eine parallele Chemotherapie fand nicht statt. Das Alter der jüngsten Patientin betrug bei Therapie 43, das der ältesten 77 Jahre. Unter den Patientinnen waren acht Raucherinnen (93, 104, 110, 113, 114, 129, HS6, HS13). Alle Frauen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Bei 20 der Patientinnen wurde vor der ersten Bestrahlung eine Blutprobe zur Isolation von Lymphozyten sowie eine Hautbiopsie vom Oberarm für die Kultivierung von Fibroblasten entnommen (prospektive Gruppe). Eine zweite Blutentnahme erfolgte nach Abschluß der Radiotherapie. Die anderen zehn Patientinnen wurden retrospektiv aufgrund ihrer starken akuten Strahlenreaktionen für die Studie ausgewählt. Bei ihnen fand deshalb die Entnahme von Blutprobe und Hautbiopsie für die experimentelle Untersuchung nach Bestrahlungsbeginn statt.

Bei insgesamt vier Patientinnen (56, 110, HS9, HS10) konnte aus der Hautbiopsie keine primäre Fibroblastenkultur angezüchtet werden.

In zehn Fällen (89, 107, 114, 116, 117, 118, 129, 140, 141 und 143) wurden die vor Bestrahlung entnommenen Lymphozyten zweimal in einem Erst- und einem Wiederholungsexperiment untersucht, um die Reproduzierbarkeit der Testmethode zu überprüfen. Zusätzlich führte man den Versuch zum Vergleich auch mit den Lymphozyten durch, die nach Abschluß der Bestrahlung gewonnen wurden.

Die akuten Strahlenreaktionen der Haut wurden vom klinischen Untersucher nach Ende der Therapie anhand der RTOG-Graduierungsskala in die Grade 0 – 4 eingeteilt (siehe Tabelle 2.2). Entsprechend der Stärke der Hautreaktion nach Bestrahlung wurden zwei Patientinnengruppen gebildet: Gruppe A mit Strahlenreaktionen von Grad 0 – 2 sowie Gruppe B mit Grad 3 – 4.

Pat.-Nr.	Alter bei Behandlung	RTOG früh	Grund-erkrankung	Therapie	Dosis	Raucherin/Nicht-raucherin (NR)
89	71	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN0	Mamma-Zange	50Gy 12Gy Boost	NR
92	65	1	Mamma Ca BET + AD pT2N1bilateral	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
93	67	1 hyperpig.	Mamma Ca BET + AD pT2N0	Mamma-Zange	50 Gy 10Gy Boost	Raucherin
96	66	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN0	Mamma-Zange	50 Gy 10Gy Boost	NR
100	57	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN1	Mamma-Zange	50 Gy 10Gy Boost	NR
104	49	1 hyperpig.	Mamma Ca BET + AD pT1cNx	Mamma-Zange	50 Gy 10Gy Boost	Raucherin 1 Pack./d
107	49	2	Mamma Ca Rez. BET pT1cN0	Mamma-Zange	50Gy 16Gy Boost	NR
108	60	1	Mamma Ca BET + AD pT2N0	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
112	64	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN1	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
113	56	1	Mamma Ca BET + AD pT1bN0	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin 15-20/d
114	54	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN0	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin
115	58	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN0	Mamma-Zange	50Gy 16Gy Boost	NR
116	77	2	Mamma Ca BET + AD pT2N0	Mamma-Zange	50Gy 10Gy Boost	NR

117	59	1	Mamma Ca BET + AD pT1cN0	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
118	59	1	Mamma Ca BET + AD pT2N1bilateral	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
120	67	1	Mamma Ca BET + AD pT2N1bilateral	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
129	46	1	Mamma Ca BET + AD pT2N0	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin
140	60	0	Mamma Ca BET + AD pT1aN0	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
143	65	0	Mamma Ca BET + AD pT1aN0	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
56	58	3	Mamma Ca BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
110	58	3	Mamma Ca BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin
141	61	2	Mamma Ca BET + AD pT2N0	Mamma- Zange	50GY 6Gy Boost, dann Thera- pieabbruch	NR
144	43	3	Mamma Ca BET + AD pT1cN1bilateral	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
HS 6	49	3	Mamma Ca bds. BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin
HS 8	48	3	Mamma Ca BET + AD pT1aN0 M1(Leber)	Mamma- Zange	50Gy 4Gy Boost, dann Thera- pieabbruch	NR
HS 9	55	3	Mamma Ca BET + AD pT2N1	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
HS 10	47	2	Mamma Ca BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
HS 13	44	3	Mamma Ca BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	Raucherin

			pT2N1bilateral			
HS 14	67	3	Mamma Ca BET + AD pT1bN0	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR
HS 15	58	3	Mamma Ca BET + AD	Mamma- Zange	50Gy 10Gy Boost	NR

**Tabelle 2.1: Patientendaten – Alter und Raucherstatus, Grad der Hautreaktion nach Bestrahlung, Tumorstadium und Behandlung; BET = Brusterhaltende Therapie, AD = Axilladisektion, NR = Nichtraucherin**

Grad 0:	kaum sichtbare Reaktion
Grad 1:	follikulär; schwaches Erythem; trockene Desquamation
Grad 2:	zartes oder leuchtendes Erythem; fleckige, feuchte Desquamation
Grad 3:	konfluente, feuchte Desquamation
Grad 4:	Ulzeration, Hämorrhagie, Nekrose

**Tabelle 2.2: RTOG-Graduierungsskala zur Beurteilung akuter radiogener Hautreaktionen**

## 2.2 Behandlung der Patienten

Alle 30 Brustkrebspatientinnen erhielten nach Tumorexstirpation bei Erhaltung der Brust eine Radiotherapie. Die Bestrahlung erfolgte über zwei schräge Gegenfelder (Zangentchnik) unter Einschluß der Brust mit einem 10 MV Linearbeschleuniger. Die Dosis betrug insgesamt 60 Gy, aufgeteilt in 25 Fraktionen zu 2 Gy, und abschließendem Boost (10 Gy). Bestrahlt wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen der Woche. Bei den Patientinnen 141 und HS 8 mußte die Therapie bei 56 Gy bzw. 54 Gy wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden.

## 2.3 Präparation der Zellen

### 2.3.1 Lymphozyten

Die Isolation der Lymphozyten erfolgte maximal zwei Stunden nach Blutentnahme durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Histopaque 1077. 3,0 ml Histopaque wurden in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden gegeben und die



Flüssigkeit auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wurde sie vorsichtig mit 3,0 ml Vollblut überschichtet und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 400xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ließen sich vier Schichten erkennen. Die unterste Lage bestand aus Erythrozyten, dann folgten eine klare Schicht Histopaque 1077 sowie eine undurchsichtige, milchige Schicht aus Lymphozyten und zuoberst Plasma. Die oberste Schicht wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Dann wurde die undurchsichtige Interphase (Lymphozyten) abpipettiert, in ein neues Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden gegeben, 10 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma) zugefügt und durch vorsichtiges Aspirieren gemischt. Man zentrifugierte 10 Minuten bei 250xg, pipettierte den Überstand ab und verwarf ihn. Der Bodensatz wurde mit 5,0 ml PBS resuspendiert. Es wurde erneut 10 Minuten bei 250xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz aus Lymphozyten in 1,5 ml Einfriermedium, welches RPMI 1640, 10% fetales Kälberserum (FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, aufgenommen. Die Probe wurde daraufhin bei -80°C eingefroren.

Ein oder zwei Stunden vor Bestrahlung wurden die Zellen schnell aufgetaut und nach Zugabe von 5 – 10 ml komplettem Wachstumsmedium bestehend aus RPMI 1640 mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin für 5 Minuten bei 300xg abzentrifugiert. Den Überstand saugte man ab und resuspendierte das Pellet aus Lymphozyten mit 1 – 1,5 ml RPMI, so daß die finale Zelldichte  $10^6$  Zellen / ml betrug. Bis zur Weiterverwendung gab man die Probe in einem beschichteten Eppendorff-Cap in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **2.3.2 Fibroblasten**

Die Entnahme der Hautprobe erfolgte in Lokalanästhesie (Infiltration der Haut mit 1% Lidocain) von der Oberarmaußenseite der Patientinnen außerhalb der bestrahlten Region. Die Probe wurde in einem Behälter mit PBS auf Eis ins Labor transportiert, wo sie von subkutanem Fett befreit und in kleine Teile zerschnitten wurde. Diese gab man in eine Primaria – Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) und ließ sie mit einer kleinen Menge fetalem Kälberserum antrocknen, bevor man 5 ml Kompletmedium

(DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Steptomycin) zufügte und die Flasche in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) stellte.

Nach einem Zeitraum von einer bis zu acht Wochen wuchsen erste Fibroblasten aus den Hautstückchen aus, die nach und nach den Boden der Kulturflasche in einem dichten Zellrasen bedeckten. Um die Zellen in ihrem exponentiellen Wachstum zu halten, wurden sie dann in eine größere Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) mit 10 ml Medium überführt. Sobald diese dicht bewachsen war, verteilte man die Fibroblasten auf zwei große Flaschen. Etwa einmal in der Woche erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Versuchsdurchführung benötigte man eine dicht bewachsene Kulturflasche mit Zellen in der dritten bis sechsten Passage. Etwa zwei Stunden vor Bestrahlung wurden die Fibroblasten abgelöst. Dazu saugte man zunächst das Medium ab, gab 10 ml PBS in die Flasche und stellte sie für 10 Minuten in den Brutschrank. Dieser Schritt diente zur vollständigen Entfernung des im Medium enthaltenen FCS, welches die enzymatische Wirkung des anschließend zugegebenen Trypsins beeinträchtigen könnte.

Das PBS wurde wieder abgesaugt, die Fibroblasten mit ca. 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch das Enzym wird der Zellkontakt aufgehoben. Die Zellen kugeln sich ab und lösen sich vom Boden. Nach Ablösung der Zellen pipettierte man etwa 5 ml Medium hinzu, überführte die Zellsuspension in eine 15-ml Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden und zentrifugierte für 7 Minuten bei 150xg. Der Überstand wurde danach abgesaugt und der Bodensatz aus Fibroblasten in 1.5 ml Medium resuspendiert, so daß die Zelldichte etwa 10<sup>6</sup> Zellen / ml betrug. Die Zellzahl bestimmte man in einer Zählkammer nach Neugebauer. Die Probe wurde in einem beschichteten Eppendorff-Cap, in dem die Zellen nicht adhären werden, bis zur Weiterverarbeitung im Brutschrank aufbewahrt.

## **2.4 Bestrahlung der Zellen**

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einem 10 MV Linearbeschleuniger in genau definiertem Abstand zur Strahlenquelle. Die Dosis betrug für Lymphozyten 3 Gy, für Fibroblasten 5 Gy. Die 1-Minuten-Proben zur Bestimmung des Initialschadens wurden in Agarose eingebettet auf Objektträgern bestrahlt, die übrigen Zellen als Suspension in

einer 4-Well-Kulturplatte. Um vorzeitigen Reparaturprozessen vorzubeugen, bestrahlte man die Zellen bei ca. 0°C auf Eis. Nach kurzem Transportweg gab man die 1-Minuten-Proben schnell in kalte LyseLösung, in der keine Reparatur mehr erfolgen konnte. Die Suspension wurde aus der 4-Well-Platte in ein Reagenzglas überführt und in den Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt, um eine Reparatur des nach Bestrahlung aufgetretenen DNS-Schadens zu ermöglichen. Zu bestimmten Zeitpunkten (5, 10, 20, 30 und 40 Minuten nach Bestrahlung) entnahm man einen Teil der Zellen und bettete sie wie bei der 1-Minuten-Probe in Agarose auf Objektträger ein. So fixierte man die Zellen in ihrem Reparaturstadium und konnte das Ausmaß der Reparatur zu den verschiedenen Zeiten und damit die Reparaturgeschwindigkeit ermitteln.

## **2.5 Comet Assay**

Der Comet Assay wurde in Anlehnung an das Protokoll von Singh et al. [1988] unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Man beschichtete einen angerauhten Objektträger mit 400 µl hoch schmelzender Agarose (0,75% HMA in PBS), die zur Verflüssigung auf ca. 45°C erwärmt wurde, bedeckte diese mit einem Deckgläschen und ließ sie für etwa 10 Minuten im Kühlschrank bei 4°C erstarren. Es wurden je drei Objektträger für jeden Meßzeitpunkt sowie als unbestrahlte Kontrollproben präpariert. Anschließend mischte man 15 µl der vorbereiteten Zellsuspension (entspricht etwa 15000 Zellen) mit 85 µl niedrig schmelzender Agarose (0,5% LMA in PBS). Nach Entfernung des Deckgläschens übertrug man diese Zell-Agarose-Mischung auf die erste Agaroseschicht, legte ein neues Deckgläschen darüber und ließ sie für etwa 10 Minuten bei 4°C härten. Daraufhin wurde das Deckgläschen abgezogen, die Zellage auf dem Objektträger mit 100 µl niedrig schmelzender Agarose überschichtet, ein frisches Deckgläschen aufgelegt und die Verfestigung abgewartet. Man entfernte das Deckgläschen dann wieder und stellte die Objektträger für mindestens eine Stunde lichtgeschützt in gekühlte LyseLösung (Lysepuffer – 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris, 1% NaSacrosinat, pH = 10; 1% Triton X-100 und 10% DMSO unmittelbar vor Gebrauch zusetzen) zur Auflösung der Zellmembranen und Entfaltung der DNA-Knäuel.

Die Objektträger wurden dann aus der Lyselösung herausgenommen und in eine horizontale, in einer Wanne mit Eis stehende Elektrophoresekammer gelegt, welche Platz für 16 Objektträger bot. Da für jeden Meßzeitpunkt drei Proben zur Verfügung standen, suchte man für 10, 20, 30 und 40 Minuten und die unbestrahlte Kontrollprobe zwei davon aus, für 1 Minute und 5 Minuten wurden alle drei verwendet. Anschließend goß man frischen gekühlten Elektrophoresepuffer (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH = 13,5) in die Kammer gegossen, bis die Objektträger etwa 0,25 cm hoch bedeckt waren, dunkelte die Kammer ab und wartete 20 Minuten, in denen sich die DNA weiter entfalten konnte. Nach dieser Zeit begann die 20minütige Elektrophorese bei 25V und 300mA, wobei die Objektträger in dem Puffer liegen blieben. Daraufhin nahm man die Proben aus der Kammer, beträufelte sie zur Entfernung von Alkali- und Detergentienresten vorsichtig mit einer Neutralisationslösung (0,4M Tris, pH = 7,5) aus einer Pipette und legte sie dann für 10 Minuten horizontal in eine mit derselben Lösung gefüllte flache Schale. Nach der Neutralisation färbte man die Zellkerne auf den Objektträgern mit 50 µl Ethidiumbromid (20 µl / ml H<sub>2</sub>O dest.) an und legte zum Schutz ein Deckgläschen darauf. Die Proben wurden in einer feuchten Kammer bis zur Analyse aufbewahrt, damit das Agarosegel nicht austrocknet. Die Auswertung des Versuchs erfolgte innerhalb von 24 Stunden.

Zur Vermeidung von zusätzlichen DNS-Schäden wurden alle beschriebenen Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum durchgeführt.

Abbildung 2.5 gibt den Ablauf des Comet Assay schematisch wieder.

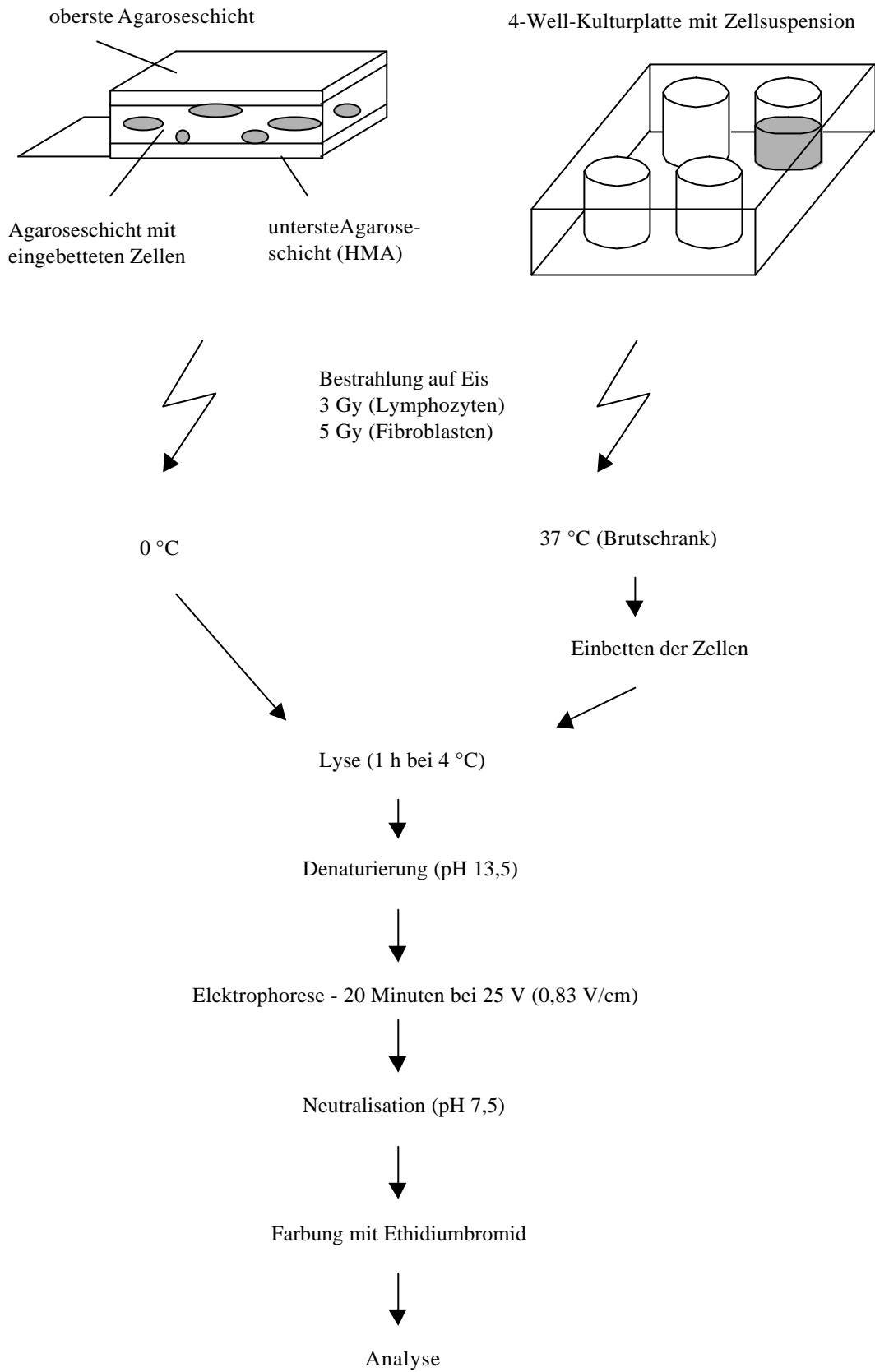


Abbildung 2.5: schematischer Ablauf des Comet Assay

## 2.6 Analyse

Die Messung des DNA-Schadens erfolgte mit einem Bildanalyseverfahren. Die mit Ethidiumbromid angefärbten Zellkerne auf den Objektträgern wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht, welches in Verbindung stand zu einer Videokamera und einem PC mit dem Bildanalyseprogramm Komet 3.1. Man konnte die durch das Mikroskop betrachteten Zellen auf einem Monitor einstellen und mit Hilfe des Computerprogramms analysieren, welches eine Vielzahl von Parametern maß. Die Photos geben beispielhaft das Bild von „Kometen“, wie man sie unter dem Fluoreszenzmikroskop sieht, wieder. Zur Quantifizierung des DNS-Schadens wurde der Tail moment (TM)-Wert herangezogen. Er ist definiert als Produkt aus dem Prozentanteil von DNS im Kometenschweif und der Schweiflänge, oder präziser, als Produkt aus Schweif-DNS (in %) und Distanz zwischen Kopfbereich und Schweifzentrum.

$$\text{Tail Moment} = \text{Tail DNS (\%)} * \text{Tail Distance}$$

Pro Reparaturzeitpunkt standen zwei bzw. drei (1 Minute und 5 Minuten) Objektträger zur Verfügung, von denen insgesamt zwischen 50 und 100 Zellen analysiert wurden. Apoptotische Zellen, welche Tail Moment-Werte über 50 ergaben, und verzernte Zellen am Rand der Objektträger wurden nicht gemessen.

## 2.7 Auswertung der Meßergebnisse/Statistik

Die Meßergebnisse wurden mit dem Programm Origin 50 ausgewertet. Zu jedem Versuch wurden die Mittelwerte des DNS-Schadens von 50 bis 100 Zellen, angegeben als Mean Tail Moment, graphisch auf der Y-Achse gegen die zugehörigen Reparaturzeitpunkte (X-Achse) aufgetragen und eine Kurve erstellt, der die folgende monoexponentielle Funktion zugrunde lag:

$$\text{TM}(t) = \text{TM}_0 * \exp(-0,693t / \tau_{0,5}) + \text{TM}_R$$

$TM_0$  = initialer *reparierbarer* DNS-Schaden

$TM_R$  = residualer, d.h. irreparabler Restschaden

$t$  = Inkubationszeit nach Bestrahlung

$\tau_{0,5}$  = Reparaturhalbwertszeit, d.h. die Zeit, nach der 50% des DNS-Schadens repariert sind

Den initialen *Gesamtschaden* der DNS,  $TM_{IT}$ , berechnete man aus den Kurvendaten durch Addition von  $TM_0$  und  $TM_R$ , die Reparaturhalbwertszeit  $\tau_{0,5}$  durch Multiplikation der Reparaturgesamtzeit  $t_0$  mit  $\ln 2$ .

$$TM_{IT} = TM_0 + TM_R$$

$$\tau_{0,5} = t_0 * \ln 2$$

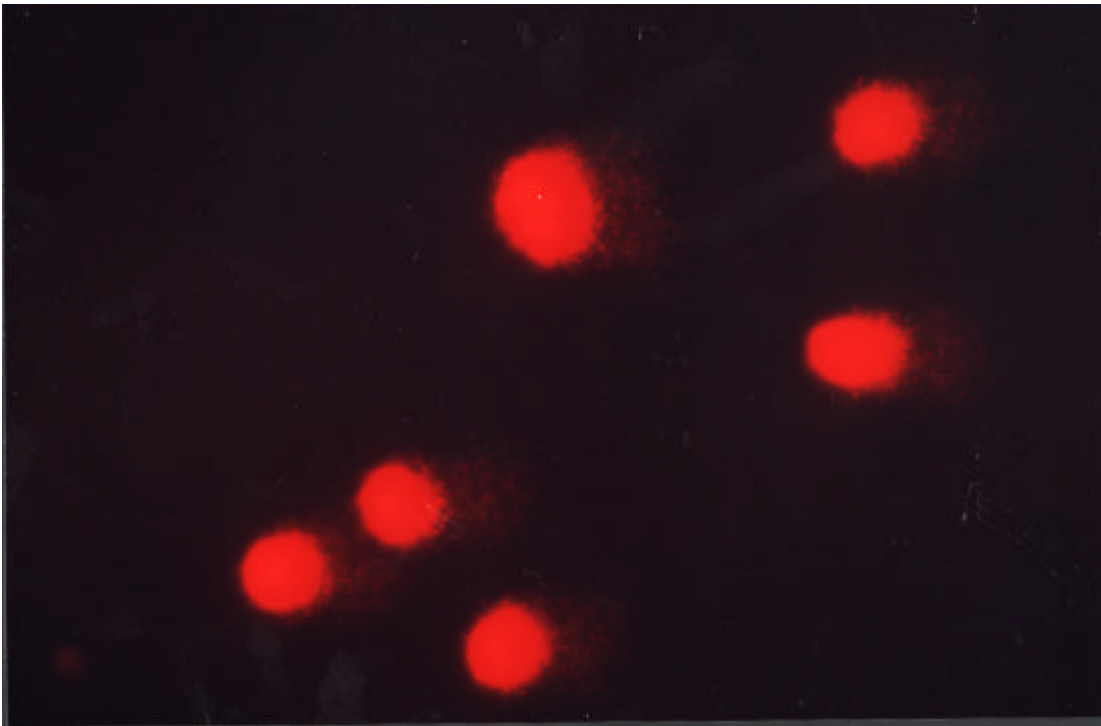
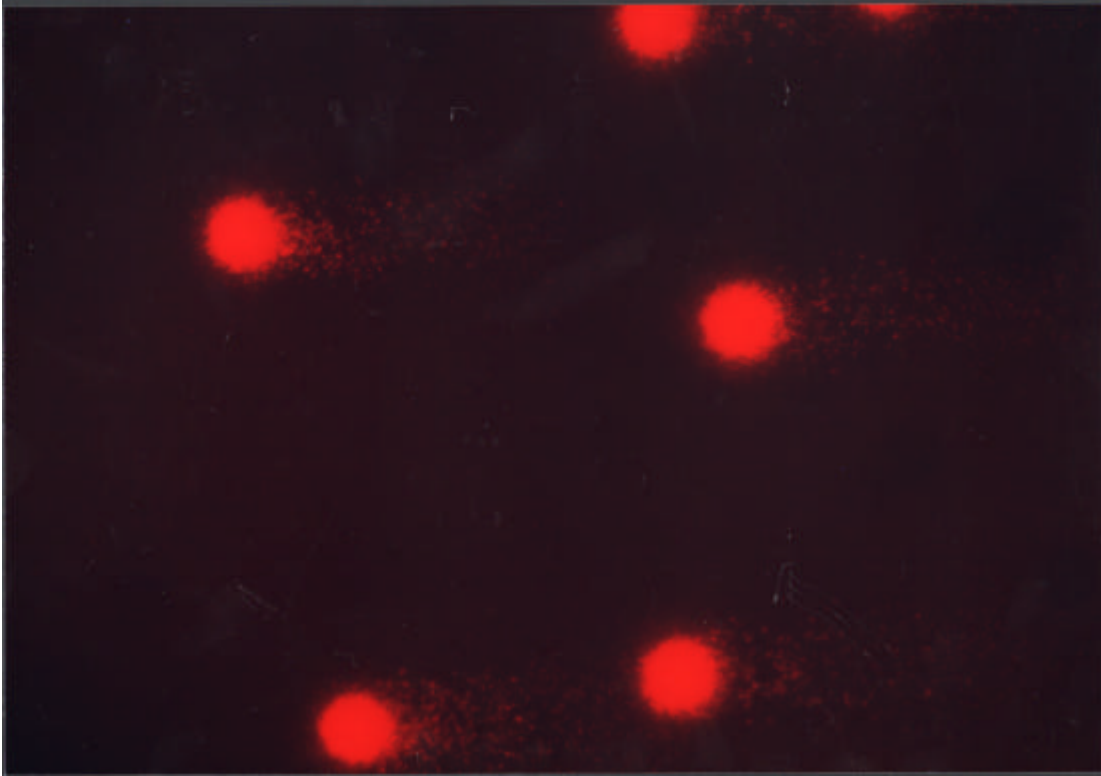
### 2.7.1 Statistik

Bei den beschriebenen Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte (+/- Standardabweichung). Zur Beurteilung der Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Mittelwerten wurde der t-Test angewandt, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant galt.

Zum Vergleich von Fibroblasten und Lymphozyten führte man eine lineare Regressionsanalyse mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r$  durch, der die Gleichung  $y = a + bx$  zugrunde lag. Dazu wurden die zum Zeitpunkt 5 Minuten mit Fibroblasten gemessenen Werte auf der Y-Achse gegen die entsprechenden Lymphozytenwerte auf der X-Achse aufgetragen.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms Statistica for Windows.

Lymphozyten (oben) und Fibroblasten (unten)





### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut und Hautfibroblasten von 30 Brustkrebspatientinnen mit 3 bzw. 5 Gy bestrahlt und das Ausmaß der DNS-Schädigung sowie die anschließende Reparatur mit Hilfe des Comet Assay gemessen. Ziel war es zu untersuchen, ob eine Korrelation besteht zwischen dem in vitro gemessenen DNS-Schaden (in Mean Tail Moment) und der akuten Hautreaktion der Patientinnen nach Bestrahlung.

Die Werte von Initialschaden, Restschaden sowie Halbwertszeit, die im Comet Assay ermittelt wurden, sind für jede Patientin in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

#### Lymphozyten

Patientin	Initialschaden TM(0) + TM(R)	Restschaden TM(R)	Halbwertszeit t0.5
Gruppe A (Grad 0-2)			
89	10,78	2,49	2,93
92	7,27	2,52	5,16
93	10,22	2,03	10,06
96	12,74	3,56	6,33
100	7,56	2,07	8,89
104	14,62	5,99	9,04
107	9,30	3,21	5,51
108	7,43	2,39	4,94
112	9,74	2,57	7,95
113	12,34	1,73	4,76
114	10,77	1,23	11,56
115	13,85	3,34	6,61
116	9,87	5,33	3,60
117	7,51	3,44	10,09
118	10,19	4,07	4,47
120	8,20	2,21	8,46
129	11,03	5,47	3,60
140	8,32	1,59	20,72
143	10,83	4,09	5,96
Mittelwert	10,14	3,12	7,40
+/- SD	2,17	1,36	4,07
+/- SE	0,50	0,31	0,93

Gruppe B (Grad 3-4)			
56	10,98	4,10	8,24
110	12,84	4,74	23,32
141	10,58	3,62	10,69
144	13,69	6,81	9,32
HS 6	11,84	4,18	11,69
HS 8	13,99	6,56	7,13
HS 9	10,25	4,65	11,13
HS 10	11,89	4,53	10,31
HS 13	11,81	5,15	4,73
HS 14	12,32	4,43	9,49
HS 15	11,98	5,48	6,52
Mittelwert	12,02	4,93	10,23
+/- SD	1,18	1,00	4,83
+/- SE	0,35	0,30	1,46
Wdh - Versuche			
89	9,74	4,49	4,89
107	10,95	3,43	10,04
114	8,91	3,56	10,28
129	10,70	4,90	5,08
140	8,07	2,09	13,02
141	11,23	2,11	16,79
143	9,16	3,60	7,69
Mittelwert	9,82	3,45	9,68
+/- SD'	1,18	1,07	4,29
+/- SE'	0,45	0,40	1,62
116	18,36	5,28	7,90
117	17,08	3,37	8,25
118	16,86	4,25	5,14
nach Bestrahlung			
89	11,16	5,27	6,67
107	7,94	3,34	9,63
114	10,36	4,02	8,40
116	8,61	2,83	10,09
117	7,09	2,94	6,92
118	9,50	4,12	3,18
129	10,00	4,59	5,40
140	9,51	4,64	4,36
141	10,43	4,64	6,09
143	9,48	5,24	2,61
Mittelwert	9,41	4,16	6,34
+/- SD	1,23	0,88	2,55
+/- SE	0,39	0,28	0,81

## Fibroblasten

Gruppe A (Grad 0-2)			
89	14,53	1,88	1,91
92	10,85	2,34	4,41
93	12,76	2,81	5,97
96	11,63	5,21	1,59
100	12,30	3,20	2,74
104	13,72	3,70	7,37
107	12,70	1,96	10,48
108	10,78	1,51	6,15
112	10,76	4,22	2,56
113	18,42	2,78	2,96
114	12,09	2,47	4,94
115	14,86	2,51	3,05
116	14,80	1,71	2,58
117	17,35	2,57	2,40
118	17,00	3,76	2,96
120	18,35	5,37	1,85
129	12,73	3,55	5,77
140	11,63	2,19	3,14
143	10,27	3,35	7,01
Mittelwert	13,55	3,00	4,20
+/- SD	2,62	1,10	2,37
+/- SE	0,60	0,25	0,54
Gruppe B (Grad 3-4)			
141	16,60	4,07	3,42
144	17,58	3,60	3,74
HS 6	18,59	3,05	2,97
HS 8	16,89	3,98	3,12
HS 13	18,17	3,14	3,01
HS 14	14,98	3,95	2,63
HS 15	17,54	5,26	3,03
Mittelwert	17,19	3,86	3,13
+/- SD	1,19	0,74	0,36
+/- SE	0,45	0,28	0,13

**Tabelle 3.1: DNA-Schädigung und Reparaturkinetik in Lymphozyten und Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen, gemessen mit dem alkalischen Comet Assay; Initial- und Restschaden sind in Mean Tail Moment angegeben, die Halbwertszeit in Minuten; zu den Mittelwerten wurden Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE) berechnet**

Der mittlere Tail Moment-Wert der unbestrahlten Kontrollen beträgt sowohl bei Lymphozyten als auch Fibroblasten etwa 2. Hier unterscheiden sich Zellen von durchschnittlich (Gruppe A) und überdurchschnittlich strahlensensiblen Patientinnen (Gruppe B) nicht.

Vergleicht man den initialen Schaden  $TM_{IT}$  von Lymphozyten der Gruppen A ( $TM_{IT} = 10,14 \pm 2,17$ ) und B ( $TM_{IT} = 12,02 \pm 1,18$ ), so resultiert ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,013$ ; Tabelle 3.2). Wenn man den t-Test mit den für den Zeitpunkt 5 Minuten gemessenen Werten durchführt, zeigt sich ein noch deutlicheres Ergebnis. Der DNS-Schaden von Lymphozyten durchschnittlich reagierender ( $TM_{5Min} = 7,39 \pm 1,97$ ) und empfindlicher Patientinnen ( $TM_{5Min} = 10,05 \pm 1,34$ ) ist hoch signifikant verschieden ( $p = 0,0005$ ; Abb. 3.5). Auch anhand des Restschadens nach 40minütiger Reparaturzeit können Lymphozyten der Gruppen A und B klar differenziert werden ( $p = 0,0007$ ). Er beträgt bei A  $3,12 \pm 1,36$ , bei B  $4,93 \pm 1,00$ . Er liegt damit um etwa 1 bzw. 3 höher als bei den unbestrahlten Kontrollen. Was die Reparaturkinetik betrifft, so reparieren die Lymphozyten der strahlenempfindlichen Frauen den DNS-Schaden nach Bestrahlung nicht signifikant langsamer ( $p = 0,097$ ). Die mittlere Reparaturhalbwertszeit  $\tau_{0,5}$  beträgt bei Gruppe A  $7,40 \pm 4,07$ , bei Gruppe B  $10,23$ .

**Tabelle 3.2: Vergleich von durchschnittlich reagierenden (A) und radiosensiblen Patientinnen (B) Mittelwerte der Meßergebnisse für Lymphozyten**

	$TM_{IT}$	$TM_{5Min}$	$TM_R$	$\tau_{0,5}$
durchschnittlich reagierende Pat.	10,14	7,39	3,12	7,40
sensible Pat.	12,02	10,05	4,93	10,23
	$p = 0,013$ *	$p = 0,0005$ ***	$p = 0,0007$ ***	$p = 0,097$ n.s.

In Gruppe A fallen die Werte der Patientin 104 auf, die im Initialschaden, im Schaden nach 5minütiger Reparatur und auch in der Reparaturhalbwertszeit höher liegen als die Werte in Gruppe B, obwohl klinisch keine erhöhte Strahlensensibilität festgestellt werden konnte.

Auch 93, 113 und 115 zeigen einen erhöhten Initialschaden über 12, Restschaden und  $\tau_{0,5}$  liegen aber niedriger als in Gruppe B.

Die Meßergebnisse sind für jede einzelne Patientin graphisch in den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 wiedergegeben. Abbildung 3.4 stellt die Mittelwerte des DNS-Schadens der Lymphozyten von Patientinnen mit durchschnittlicher und erhöhter Strahlenreaktion gegenüber.

Bei 10 Patientinnen (89, 107, 114, 116, 117, 118, 129, 140, 141 und 143) wurden die Lymphozytenversuche wiederholt und zudem die Lymphozyten aus der nach Bestrahlung gewonnenen Blutprobe untersucht. Der Vergleich von Erst- und Wiederholungsexperimenten zeigt, mit Ausnahme von 116, 117 und 118, daß sich die einzelnen Versuche gut reproduzieren lassen. Im Initialschaden unterscheiden sich die Wiederholungsmessungen ( $TM_{IT} = 9,82 \pm 1,18$ ) nicht signifikant von den zuerst durchgeführten Experimenten ( $TM_{IT} = 10,23 \pm 1,02$ ). Der p-Wert beträgt 0,425. Auch wenn man die Resultate zum Zeitpunkt 5 Minuten von Erst- und Wiederholungsversuchen gegenüberstellt, ergibt sich nach Anwendung des t-Tests für gepaarte Stichproben kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,193$ ), siehe Tabelle 3.3.

**Tabelle 3.3: Vergleich von Erst und Wiederholungsversuchen**

Mittelwerte der Meßergebnisse für Erst- und –wiederholungsexperimente mit Lymphozyten

	$TM_{IT}$	$TM_{5Min}$
Erstversuch	10,23	8,04
Wiederholung	9,82	7,27
	$p = 0,425$ n.s.	$p = 0,193$ n.s.

Die Ergebnisse der Wiederholungen von 116, 117 und 118 wurden wegen deutlicher Abweichungen nicht in die statistischen Berechnungen einbezogen.

Beim Vergleich des Initialschadens von vor und nach Bestrahlungstherapie gewonnenen Lymphozyten zeigt sich, daß die Therapie keinen signifikanten Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen besitzt ( $p = 0,082$ ). Die Gegenüberstellung der 5-Minuten-Werte stellt dies noch deutlicher heraus ( $p = 0,338$ ), siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.6.

Bei einigen Patientinnen (89, 114, 118, 129, 140 und 143) fällt bei den posttherapeutisch isolierten Lymphozyten ein erhöhter Restschaden um 4 und 5 auf, ähnlich dem bei den empfindlichen Patientinnen. Initialschaden und  $\tau_{0,5}$  sind jedoch niedrig. Der statistische Vergleich der mittleren Restschadens von vor und nach Bestrahlung isolierten Zellen ergibt keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,246$ ). Demgegenüber fällt beim Vergleich der 5-Minuten-Werte von nach Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten durchschnittlich strahlenempfindlicher Patientinnen mit Lymphozyten der Patientinnen mit überdurchschnittlicher Strahlenreaktion eine deutliche Abweichung auf ( $p < 0,0001$ ), siehe Abbildung 3.7.

**Tabelle 3.4: Vergleich von vor und nach Bestrahlungstherapie gewonnenen Lymphozyten**

Mittelwerte der Meßergebnisse für prä- und posttherapeutisch isolierte Lymphozyten

	TM <sub>IT</sub>	TM <sub>5MIN</sub>	TM <sub>R</sub>	$\tau_{0,5}$
vor Bestrahlung	9,92	7,59	3,45	7,91
nach Bestrahlung	9,41	7,04	4,16	6,34
	$p = 0,082$ n.s.	$p = 0,338$ n.s.	$p = 0,246$ n.s.	$p = 0,458$ n.s.

Fibroblasten weisen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen A und B vor allem im Initialschaden auf ( $p = 0,002$ ), siehe Tabelle 3.5. In Gruppe A erhält man Werte zwischen 10,27 und 18,42 (Mittelwert 13,55 +/- 2,62), in B Werte zwischen 14,98 und 18,59 (Mittelwert 17,19 +/- 1,19). Auch nach 5minütiger Inkubation sind die Resultate von durchschnittlich und überdurchschnittlich strahlensensiblen Patientinnen noch signifikant verschieden ( $p = 0,032$ ; Abb.3.12). Anhand des Restschadens lassen sie sich jedoch nicht differenzieren ( $p = 0,068$ ). TM<sub>R</sub> beträgt bei Gruppe A 3,00 +/- 1,10, bei B 3,86 +/- 0,74. Erhöhte Werte für den Restschaden von über 4 mißt man bei den Patientinnen 96, 112, 120, 141 und HS 15. Die mittlere Reparaturhalbwertszeit liegt bei A (4,20 +/- 2,37) sogar höher als bei B (3,13 +/- 0,36). Auffällig ist der hohe Wert im Fall 107 (10,48). Läßt man diesen bei Berechnung der mittleren  $\tau_{0,5}$  von von Gruppe A unberücksichtigt, so ergibt sich ein Wert von 3,85.

Die Abbildungen 3.8, 3.9 und 3.10 zeigen DNS-Schaden und Reparaturkinetik der Fibroblasten jeder Patientin. Die Mittelwerte für Gruppe A (durchschnittliche

Strahlenreaktion) und Gruppe B (erhöhte Strahlenreaktion) sind graphisch in Abbildung 3.11 gegenübergestellt.

**Tabelle 3.5: Vergleich von durchschnittlich reagierenden (A) und radiosensiblen Patientinnen (B)**  
Mittelwerte der Meßwerte für Fibroblasten

	TM <sub>IT</sub>	TM <sub>5Min</sub>	TM <sub>R</sub>	τ <sub>0.5</sub>
„durchschnittliche“ Pat.	13,55	6,52	3,00	4,20
sensible Pat.	17,19	7,88	3,86	3,13
	p = 0,002 **	p = 0,032 *	p = 0,068 n.s.	p = 0,251 n.s.

Fibroblasten- und Lymphozytenversuche ergeben unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf Initial-, Restschaden und Reparaturkinetik, wobei allerdings beide Zellarten mit unterschiedlicher Dosis (5 Gy bzw. 3 Gy) bestrahlt wurden. Fibroblasten zeigen einen insgesamt höheren Initialschaden (13,55 bei A und 17,19 bei B) als Lymphozyten (10,14 bzw. 12,02), der Restschaden nach 40minütiger Reparatur ist jedoch geringer. Er beträgt in Gruppe A 3,00 gegenüber 3,12 bei Lymphozyten, in Gruppe B 3,86 (Fibroblasten) gegenüber 4,93 (Lymphozyten). Fibroblasten reparieren den DNS-Schaden nach Bestrahlung sehr viel schneller als Lymphozyten. Die mittlere Reparaturhalbwertszeit von Fibroblasten der Patientinnen mit durchschnittlichen radiogenen Nebenwirkungen beträgt 4,20, die der entsprechenden Lymphozyten 7,40. Bei den sensiblen Patientinnen ergeben sich die Werte 3,13 (Fibroblasten) und 10,23 (Lymphozyten).

Die lineare Regressionanalyse zum Vergleich der beiden Zellarten zeigt eine signifikante Korrelation mit  $p = 0,0003$  und dem Korrelationskoeffizienten  $r = 0,65$  (Abb. 3.13).

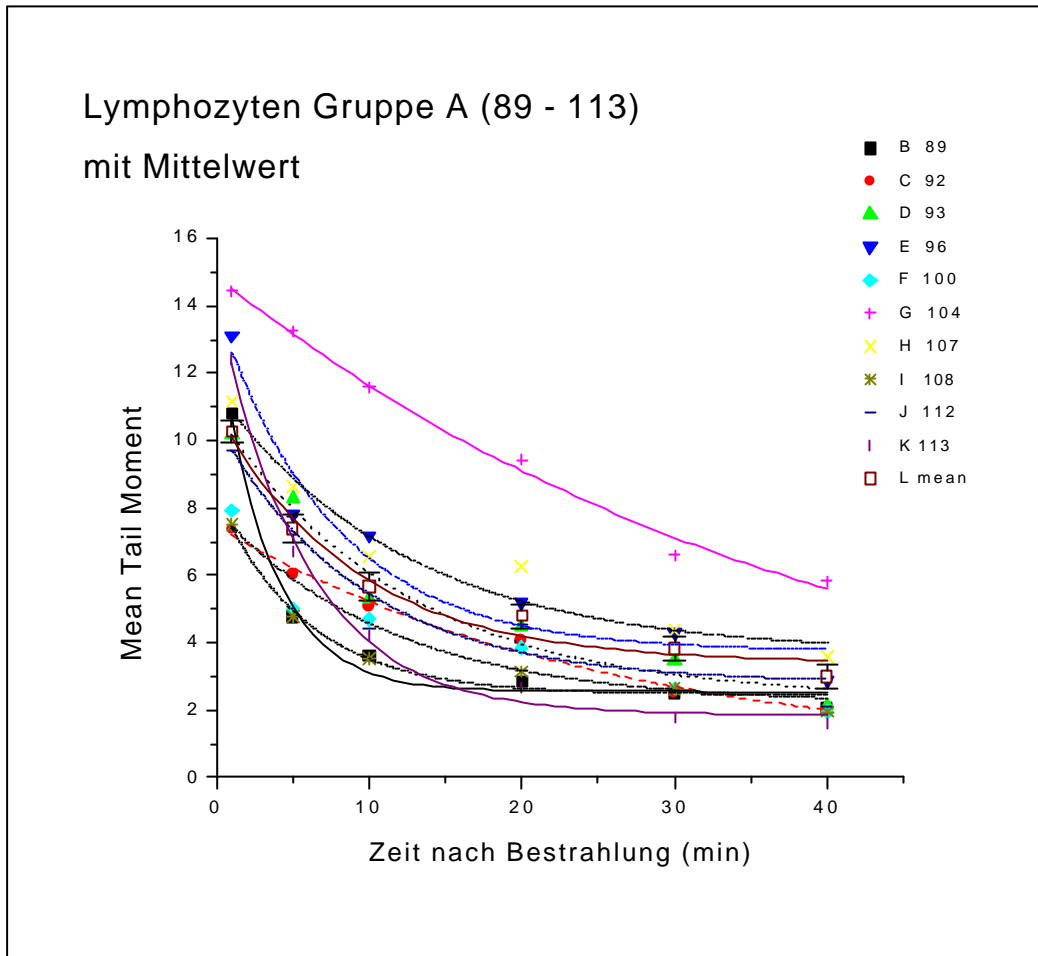


Abbildung 3.1: DNS-Schädigung und Reparaturkinetik von Lymphozyten der Patientinnen 89 - 113 mit „durchschnittlicher“ Strahlenreaktion nach Bestrahlung mit 3 Gy



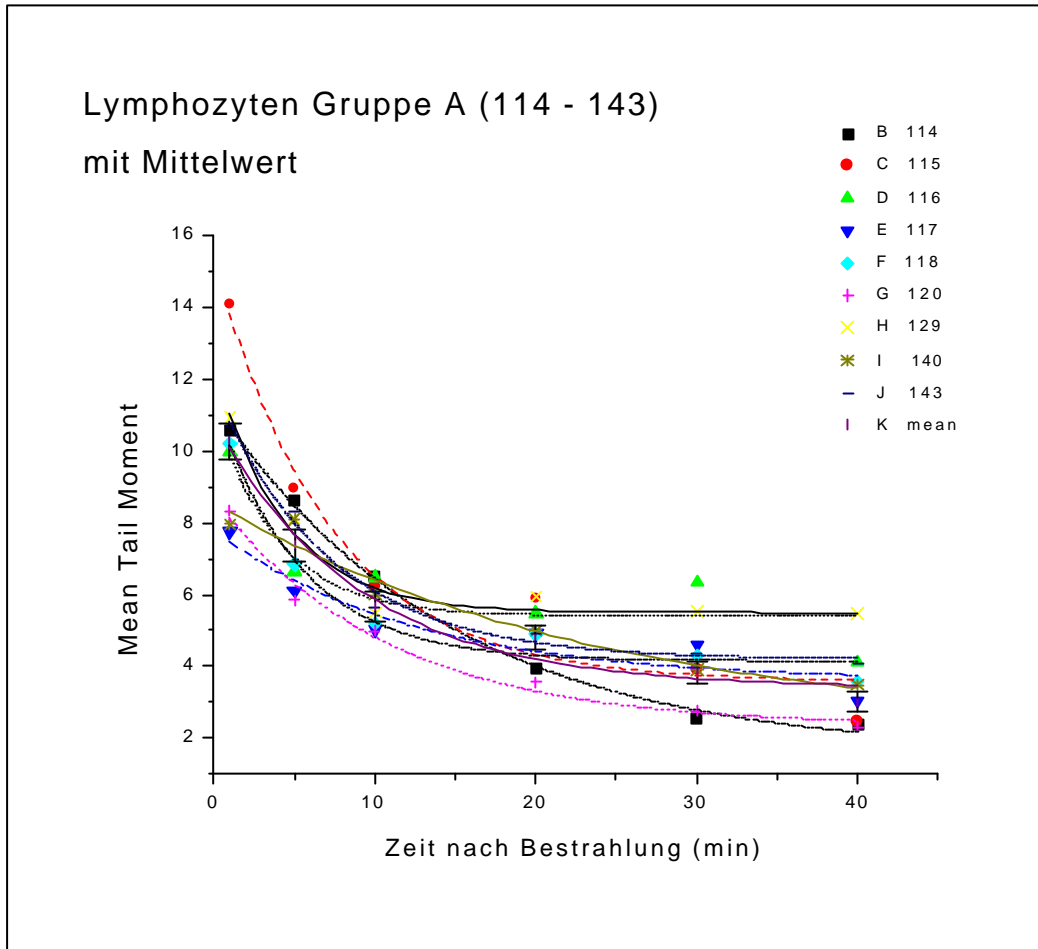


Abbildung 3.2: DNA-Schädigung und Reparaturkinetik von Lymphozyten der Patientinnen 114 – 143 mit klinisch durchschnittlichen radiogenen Nebenwirkungen

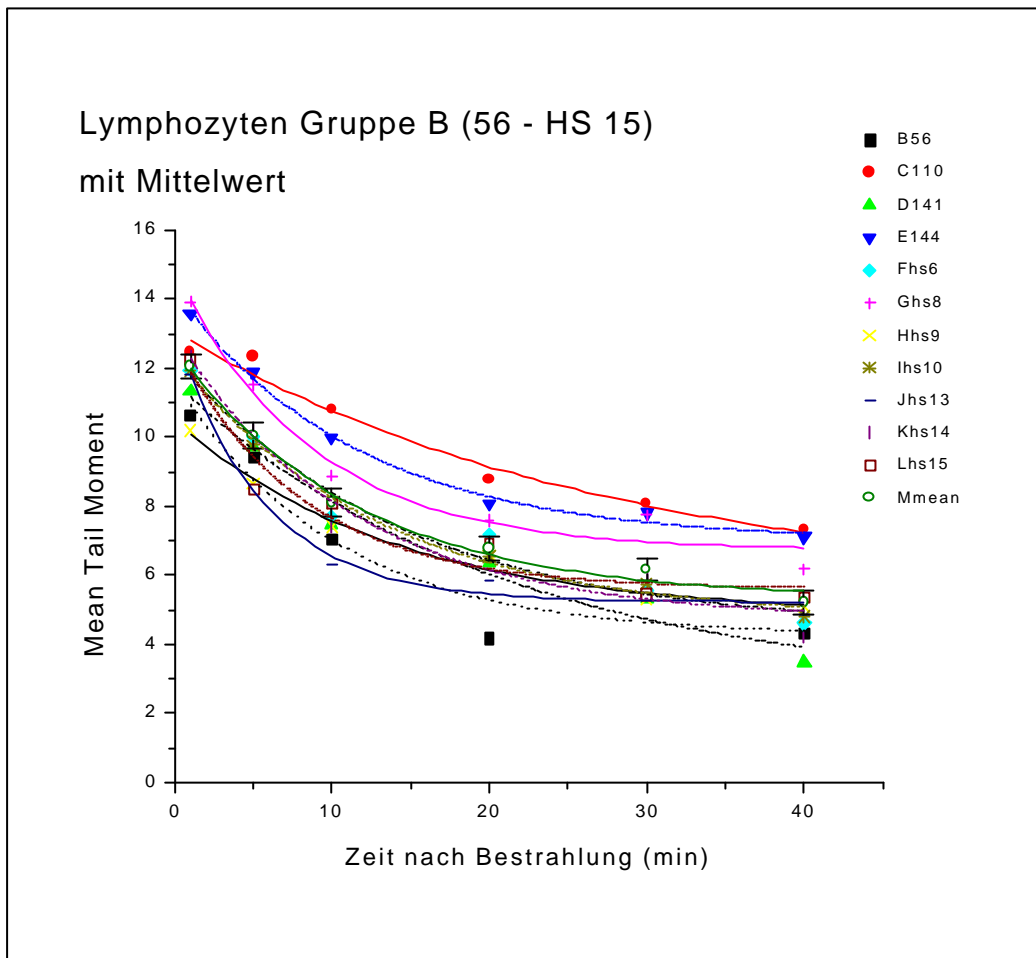


Abbildung 3.3: DNS-Schädigung und Reparaturkinetik bei Lymphozyten der Patientinnen 56 – HS 15 mit erhöhter Strahlenreaktion

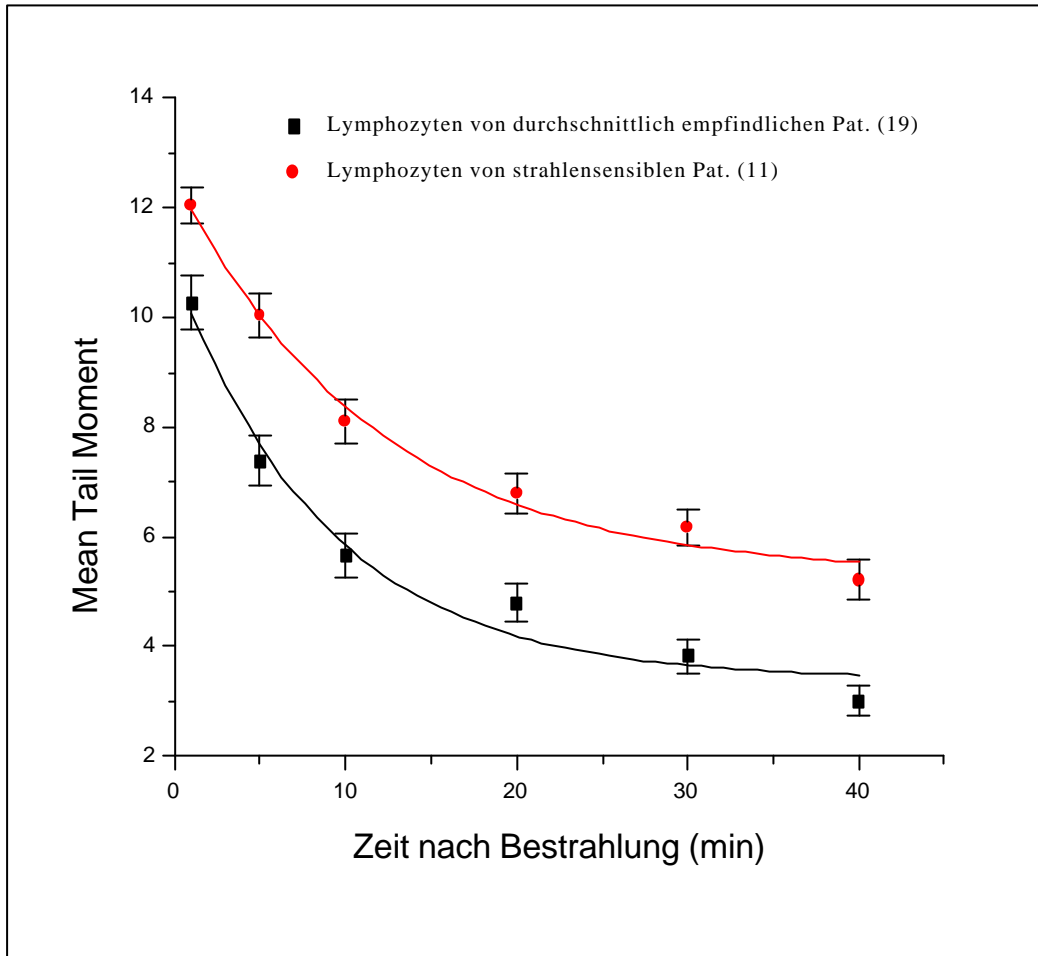
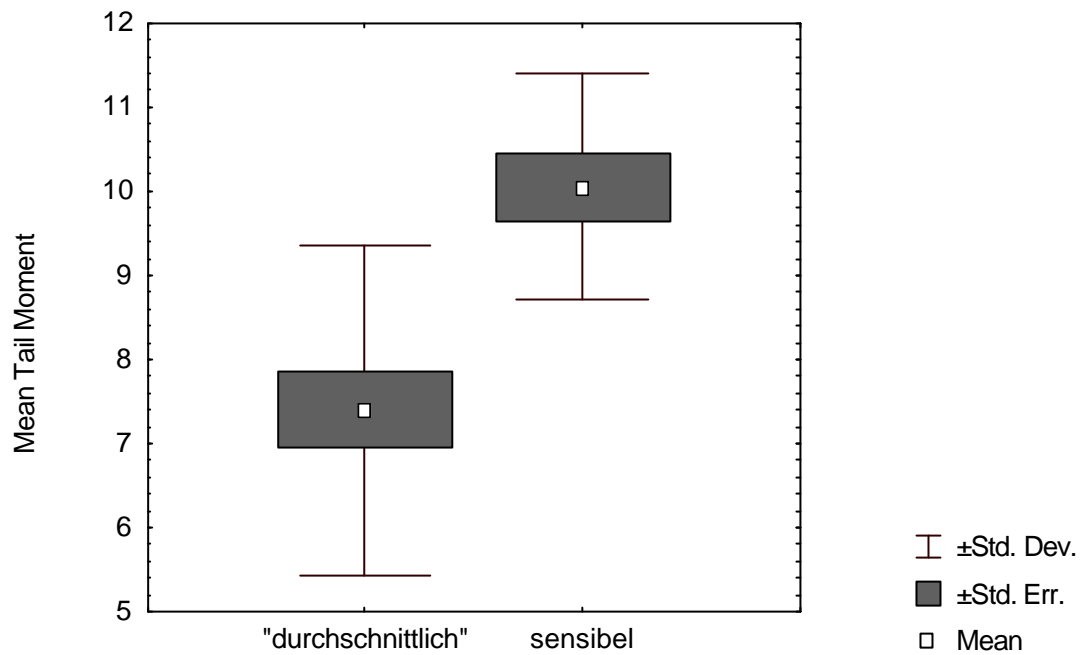


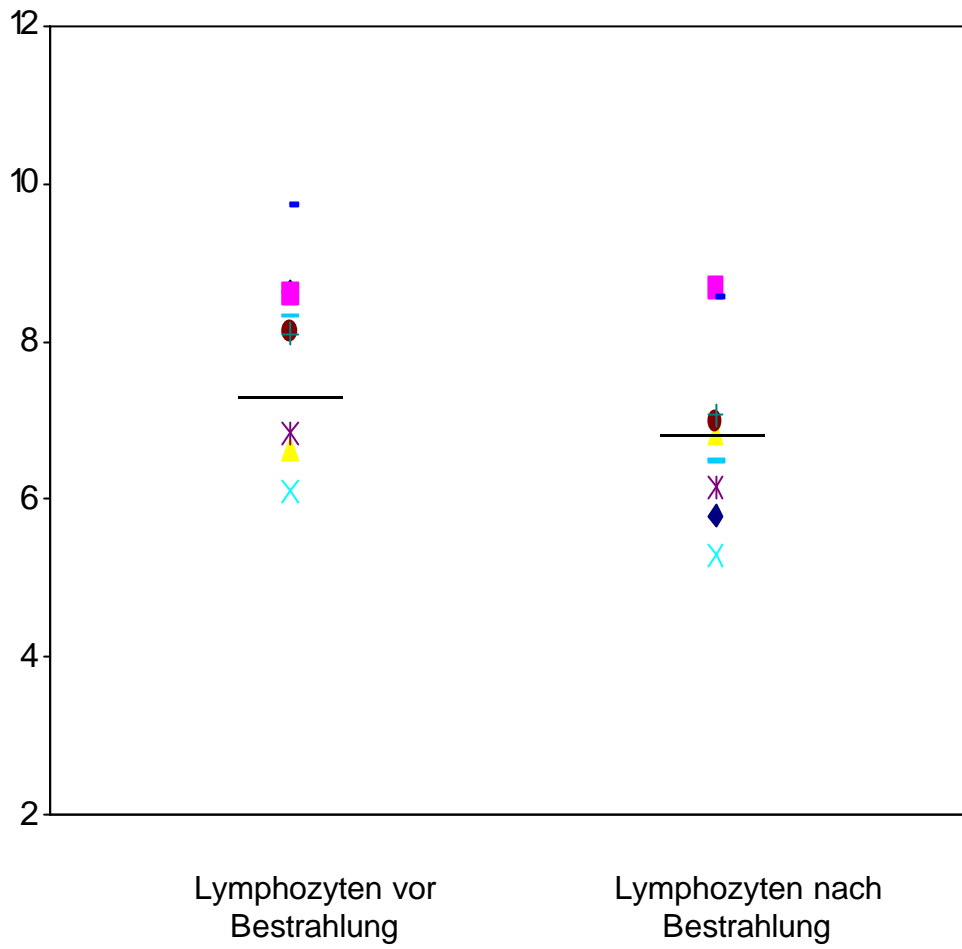
Abbildung 3.4: Mittelwert des DNS-Schadens (+/- Standardfehler) von durchschnittlich reagierenden (Grad 0-2) und strahlensensiblen Patientinnen (Grad 3-4), gemessen mit Lymphozyten

5-Min-Werte von durchschnittlich empfindlichen und sensiblen Pat. (Lympho.)



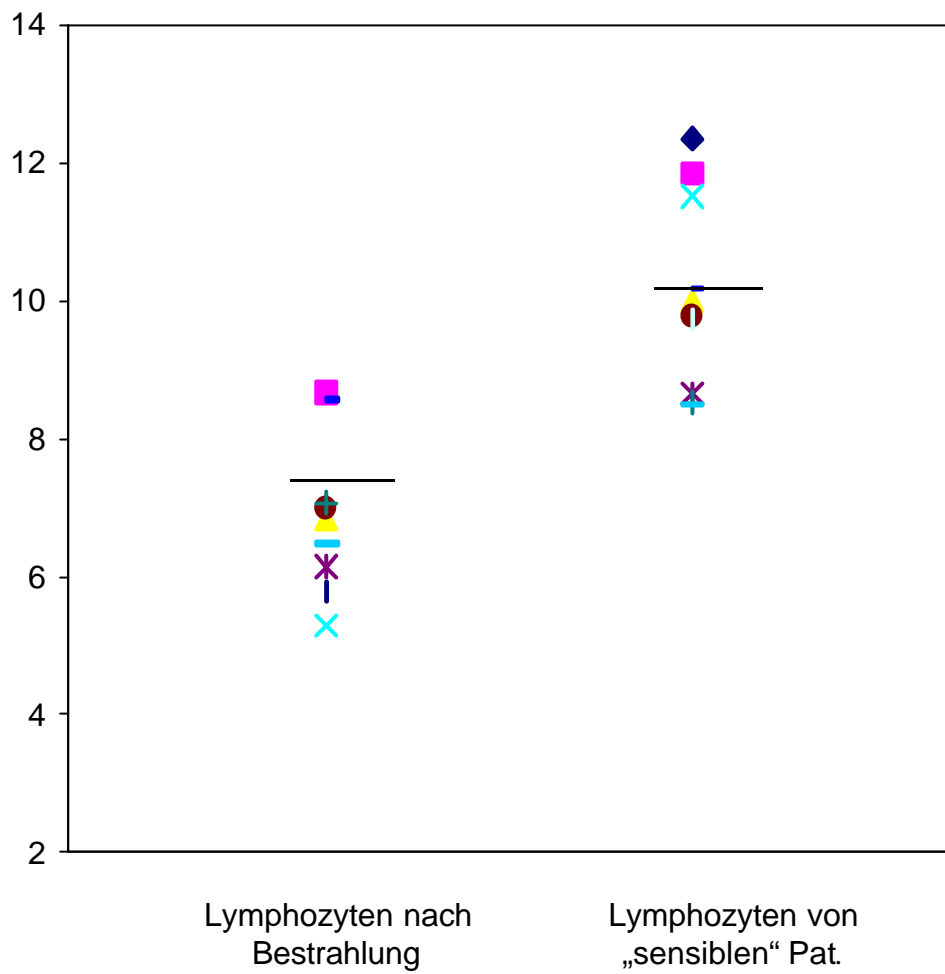
$p = 0,0005$  \*\*\*

Abbildung 3.5: Mittelwert des DNS-Schadens nach 5minütiger Reparatur von durchschnittlich strahlenempfindlichen und sensibel reagierenden Patientinnen, gemessen mit Lymphozyten



$p = 0,338$  n.s.

**Abbildung 3.6: Vergleich des DNA-Schadens nach 5minütiger Reparatur von vor und nach Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten (mit Mittelwert)**



$p < 0,0001$  \*\*\*

**Abbildung 3.7: Vergleich der 5-Minuten-Werte von den nach Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten klinisch durchschnittlich reagierender Patientinnen und den Lymphozyten der überdurchschnittlich strahlenempfindlichen Patientinnen (mit Mittelwert)**

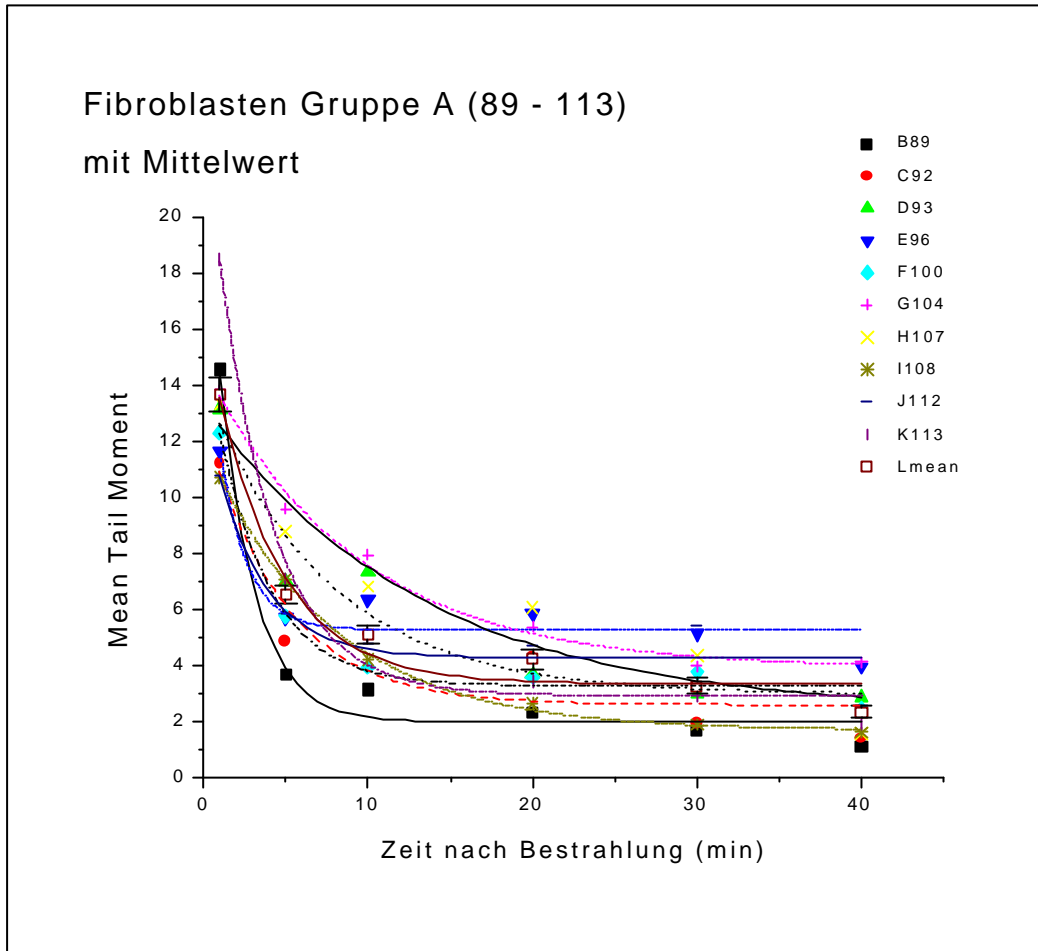


Abbildung 3.8: DNS-Schädigung und Reparaturkinetik von Fibroblasten der klinisch durchschnittlich reagierenden Patientinnen 89 – 113 nach Bestrahlung mit 5 Gy

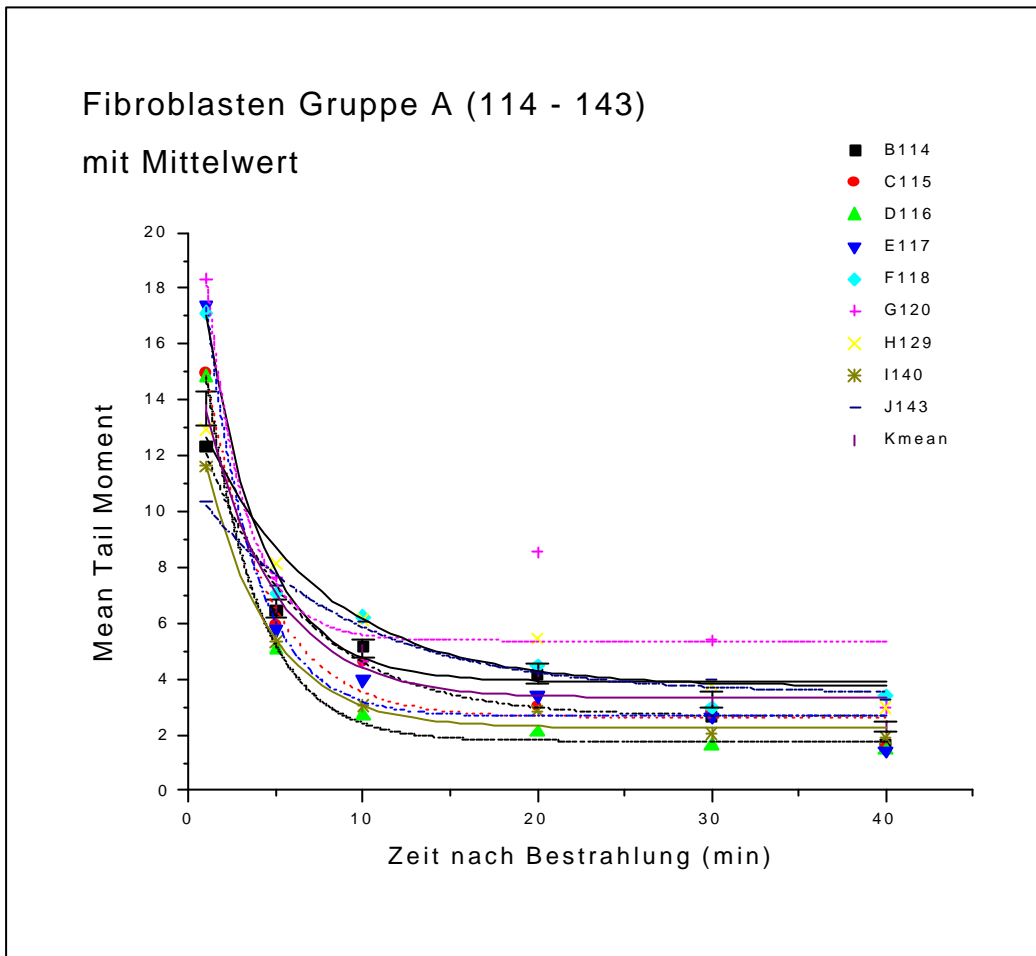


Abbildung 3.9: DNS-Schädigung und Reparaturkinetik von Fibroblasten der Patientinnen 114 – 143 mit durchschnittlichen radiogenen Nebenwirkungen



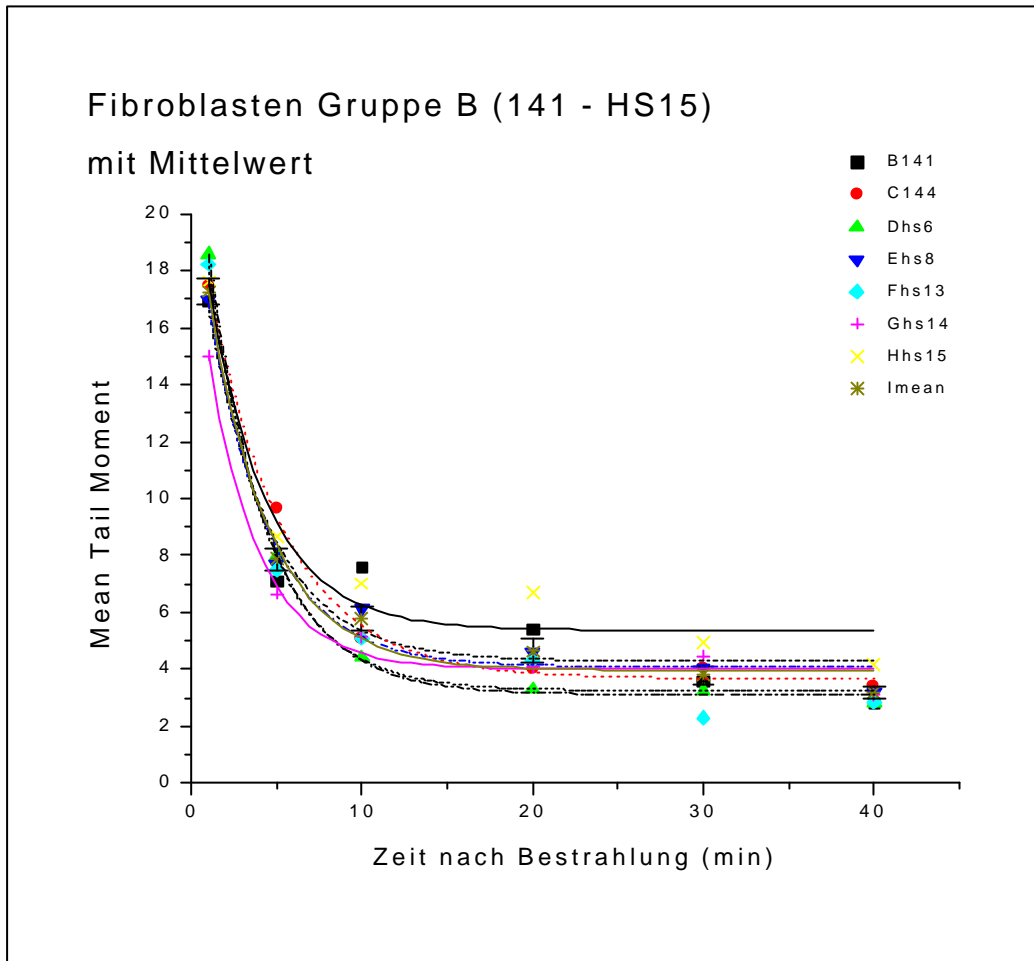


Abbildung 3.10: DNS-Schädigung und Reparaturkinetik von Fibroblasten der Patientinnen 141 – HS 15 mit erhöhter Strahlenreaktion

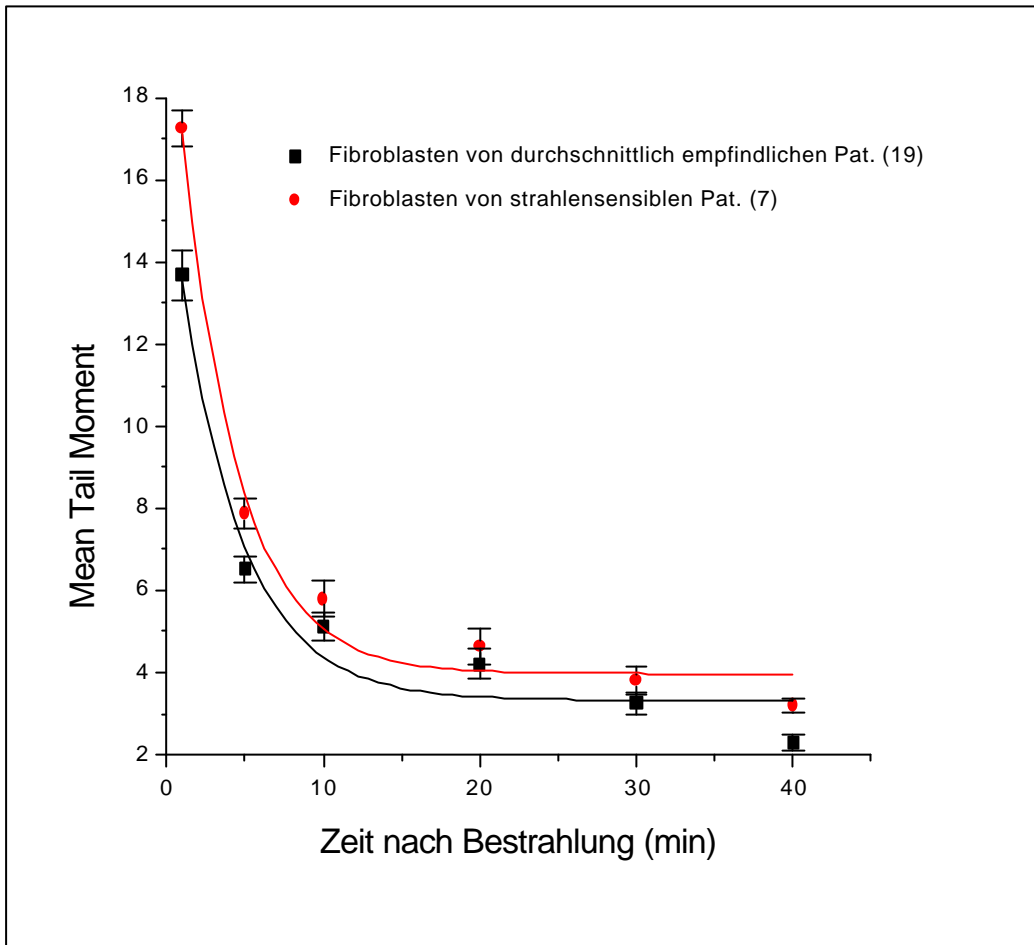
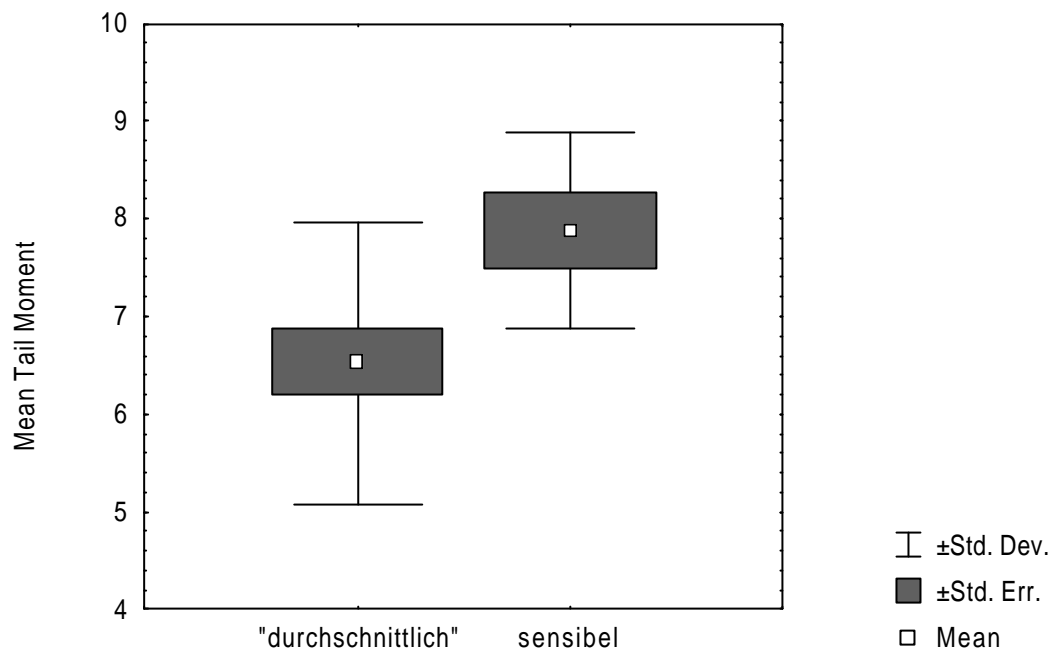


Abbildung 3.11: Mittelwert des DNS-Schadens (+/- Standardfehler) von durchschnittlich reagierenden (Grad 0-2) und strahlensensiblen Patientinnen (Grad 3-4), gemessen mit Fibroblasten

5-Min-Werte für durchschnittlich empfindlichen und sensiblen Pat. (Fibro.)



$p = 0,032^*$

Abbildung 3.12: Mittelwert des DNS-Schadens nach 5minütiger Reparatur von Fibroblasten der Patientinnen mit durchschnittlicher und erhöhter Strahlenreaktion (sensibel)

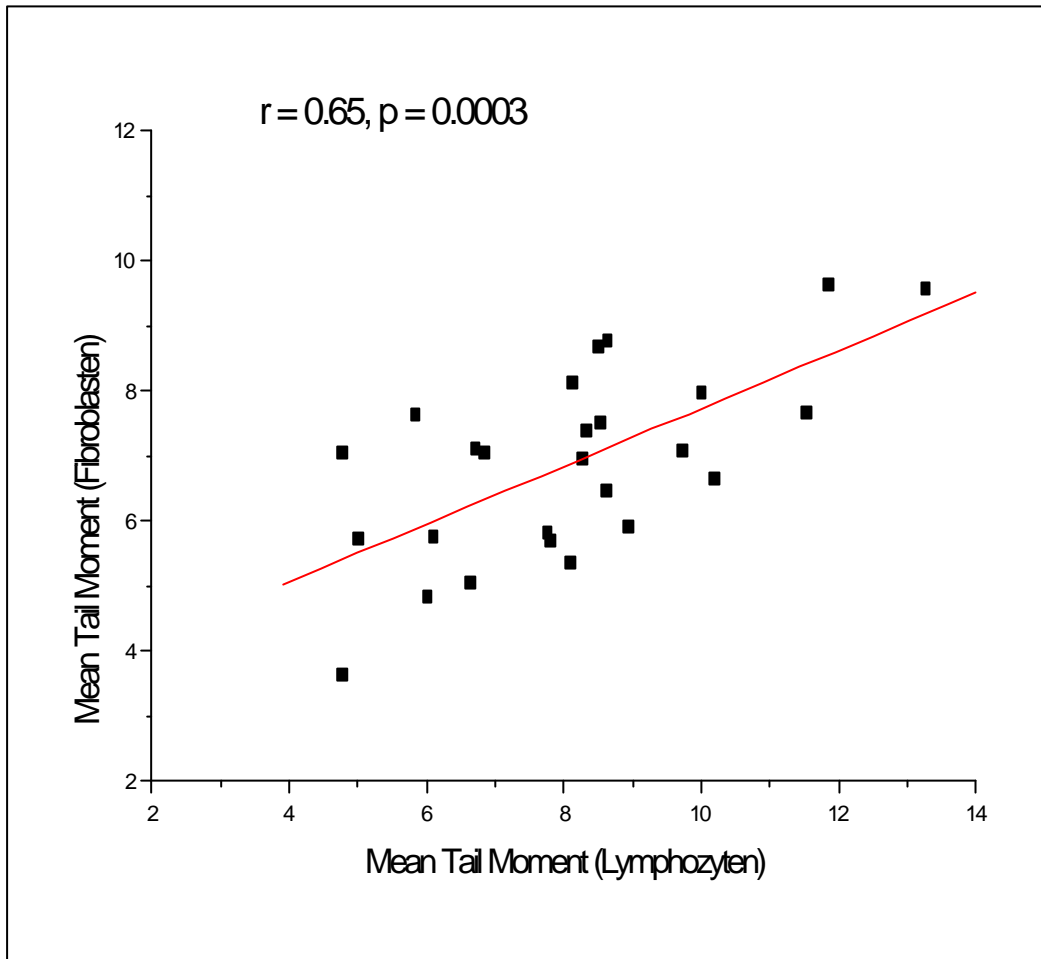


Abbildung 3.13: lineare Regressionsanalyse zum Vergleich von Fibroblasten und Lymphozyten

## 4 Diskussion

Die strahlentherapeutische Behandlung richtet sich nach der Dosis, die erforderlich ist, um den Tumor zu kontrollieren, und der Dosis, die von dem umgebenden Normalgewebe gut toleriert werden kann. Bei identischer Radiotherapie zeigen die Patienten verschieden starke akute und späte Strahlennebenwirkungen, die neben exogenen Einflüssen wahrscheinlich durch eine interindividuell unterschiedliche genetische Prädisposition bedingt sind.

Ein wichtiges Thema der strahlentherapeutischen Forschung während der vergangenen Jahre war die Entwicklung von Methoden zur Erfassung der Radiosensitivität von Malignompatienten auf zellulärer Ebene. Durch Kenntnis der individuellen Strahlenempfindlichkeit im Vorfeld der Strahlenbehandlung könnte versucht werden, die Dosis so anzupassen, daß einerseits bei sensitiven Patienten starke Nebenwirkungen verhindert bzw. andererseits bei durchschnittlich strahlensensiblen Patienten durch Dosiserhöhung eine höhere Tumorkontrolle erreicht würde.

Mit dem Koloniebildungstest, der Standardmethode zur *in vitro*-Messung von individueller Strahlensensibilität, wurden in der Vergangenheit zwar interindividuelle Unterschiede in der Radiosensitivität bei Fibroblasten gemessen [Brock et al., 1995; Burnet et al., 1994; Geara et al., 1993; Johansen et al., 1994], als prädiktiver Test ist er jedoch wegen der langen Versuchsdauer nicht geeignet.

Der Comet Assay erwies sich in strahlenbiologischen Untersuchungen als schnelle und sensitive Methode zur Erfassung von DNS-Schädigung bzw. Reparaturkinetik bei verschiedenen Zellarten. Man konnte homo- und heterozygote AT-Patienten aufgrund ihrer erhöhten Radiosensitivität mit diesem Test identifizieren [Djuzenova et al., 1999].

In der vorliegenden Studie wurden Fibroblasten und Lymphozyten von 30 Brustkrebspatientinnen, die nach brusterhaltender Operation bestrahlt wurden, mit dem Comet Assay analysiert, und die Ergebnisse mit der akuten radiogenen Hautreaktion korreliert. Die Patientinnen wurden nach dem Grad ihrer radiogenen Nebenwirkungen in die zwei Gruppen A (Hautreaktion Grad 0-2) und B (Hautreaktion Grad 3-4) eingeteilt. Man verglich den im Comet Assay gemessenen DNS-Schaden nach Bestrahlung und die Reparaturkinetik von Gruppe A und B miteinander und

untersuchte, ob sich die Zellen der Patientinnen mit durchschnittlicher und erhöhter Strahlenreaktion signifikant voneinander unterscheiden.

#### **4.1 Fibroblasten**

Die Experimente mit den Fibroblasten ergaben einen signifikanten Unterschied im Initialschaden ( $p = 0,002$ ) und auch noch im Schaden nach 5minütiger Reparatur ( $p = 0,032$ ), nicht jedoch im Restschaden ( $p = 0,068$ ) und auch nicht in der Reparaturhalbwertszeit ( $p = 0,251$ ). Der Unterschied zwischen strahlenempfindlichen und durchschnittlich auf Bestrahlung reagierenden Patientinnen liegt hier also vor allem im DNS-Schaden, der gleich nach Bestrahlung auftritt (Tabelle 3.5). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten demgegenüber die Bedeutung des Restschadens für die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten [Kiltie et al., 1997; Wurm et al., 1994; Zhou et al., 1998]. Kiltie et al. [1999] fanden eine signifikante Korrelation zwischen irreparablen Doppelstrangbrüchen und den späten Strahlennebenwirkungen bei Brustkrebspatientinnen. Der Zusammenhang zwischen Restschaden und Akutreaktion wie in der vorliegenden Studie wurde allerdings nicht untersucht.

In diesen Arbeiten wurde nicht der alkalische Comet Assay angewandt, sondern Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Graded Voltage Gelelektrophorese (GVGE) oder neutraler Comet Assay, womit man in erster Linie Doppelstrangbrüche erfaßte. Im alkalischen Comet Assay hingegen werden eine Vielzahl von DNS-Schäden, d.h. Einzel- und zum Teil auch Doppelstrangbrüche sowie alkali-labile Stellen gemessen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung und der früheren Arbeiten sind wegen der unterschiedlichen Methodik nur schwer vergleichbar.

Ähnlich wie in der aktuellen Studie konnten Oppitz et al. [1999] eine Korrelation finden zwischen der klinisch beobachteten radiogenen Normalgewebsreaktion und den Resultaten im alkalischen Comet Assay. Sie ermittelten eine verzögerte Reparatur des DNS-Schadens bei Tumorpatienten mit starken Strahlennebenwirkungen. Initialschaden und Restschaden nach 50minütiger Reparatur waren nicht erhöht im Vergleich zu Patienten ohne auffällige Strahlenschäden. Die hier untersuchten Patienten waren an verschiedenen Tumorarten erkrankt und erhielten eine unterschiedliche Behandlung. Im

Unterschied dazu wurde die vorliegende Studie an einem homogenen Patientengut durchgeführt, das aus 30 Brustkrebspatientinnen mit Tumorstadium pT1 oder pT2 bestand, die brusterhaltend operiert und nicht chemotherapiert wurden.

## 4.2 Lymphozyten

Die Durchführung des alkalischen Comet Assays mit Lymphozyten ergab eine noch stärkere Korrelation zwischen der klinisch beobachteten und der in vitro gemessenen Strahlenempfindlichkeit als bei Fibroblasten. Lymphozyten von Patientinnen der Gruppen A und B unterschieden sich signifikant im Initialschaden ( $p = 0,013$ ), deutlicher aber noch im Schaden nach 5minütiger Reparatur ( $p = 0,0005$ ) und im Restschaden nach 40 Minuten ( $p = 0,0007$ ). Die Reparaturgeschwindigkeit war bei Lymphozyten von strahlenempfindlichen Patientinnen jedoch nicht signifikant langsamer als bei Lymphozyten von Patientinnen mit normalen radiogenen Nebenwirkungen ( $p = 0,097$ , siehe Tabelle 3.2).

Auch bei den Lymphozyten der Gruppe A wird nach 40 Minuten der Level der unbestrahlten Kontrollen noch nicht erreicht. Die Reparatur ist also zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Man müßte also die Messungen über 40 Minuten hinaus fortführen, um den Endpunkt der Reparatur zu ermitteln. Zudem könnte die Frage beantwortet werden, ob bei Gruppe B tatsächlich ein irreparabler Restschaden bestehen bleibt oder aber die DNS-Strangbrüche so wiederhergestellt werden können, daß das Niveau von A erreicht wird, also nur eine stark verzögerte Reparatur vorliegt.

Ähnliche Resultate wie hier werden auch von anderen Autoren berichtet, die ebenfalls die Strahlenempfindlichkeit bei Lymphozyten von Tumorpatienten im alkalischen Comet Assay bestimmten und mit den klinisch beobachteten Normalgewebsreaktionen verglichen. Alapetite et al. [1999] fanden bei Brustkrebspatientinnen mit starken radiogenen Nebenwirkungen eine reduzierte Reparaturkapazität mit einem erhöhten residualen DNS-Schaden nach 60minütiger Reparatur. Ein erhöhter Residualschaden im Vergleich zu normalen Kontrollen wurde auch von Streffer C. [1997] bei bestrahlten Lymphozyten eines AT-Homozygoten sowie eines Malignompatienten mit starker akuter Strahlenreaktion beobachtet.

Homo- und heterozygote Erbträger der ATM-Gens, welches zu erhöhter Strahlenempfindlichkeit prädisponiert, zeigten im Comet Assay eine Erhöhung aller drei Parameter, Initialschaden  $TM_{IT}$ , Restschaden  $TM_R$  und Halbwertszeit  $\tau_{0.5}$  [Djuzenova et al., 1999]. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Brustkrebspatientinnen mit starken akuten Strahlennebenwirkungen fielen durch einen signifikant höheren Initial- und Restschaden auf,  $\tau_{0.5}$  war jedoch nicht signifikant von den durchschnittlich strahlensensiblen Patientinnen verschieden, so daß sie, wenn man die Ergebnisse von Djuzenova et al. hinzuzieht, wohl keine Träger des ATM-Gens sind. Dies bestätigt das Resultat der genetischen Mutationsanalyse von Oppitz et al. [1998], nach dem auffällige radiogene Reaktionen bei Malignompatienten nicht durch einen AT-Heterozygotenstatus erklärt werden konnten.

#### **4.3 Vergleich von Fibroblasten und Lymphozyten**

Fibroblasten und Lymphozyten wurden mit unterschiedlicher Dosis bestrahlt (5 Gy bzw. 3 Gy) unter der Annahme, daß Fibroblasten weniger strahlenempfindliche Zellen sind. Die Messungen mit Fibroblasten ergaben einen höheren Initialschaden, jedoch, obwohl die Zellen mit höherer Dosis bestrahlt wurden, einen geringeren Restschaden und eine schnellere Reparatur als die Messungen mit Lymphozyten. Fibroblasten scheinen besonders anfällig für DNS-Strangbrüche nach Bestrahlung zu sein. Die Expression von Reparaturgenen ist jedoch in beiden Zellarten wahrscheinlich unterschiedlich [Geara et al., 1992; Nakamura et al., 1991; Virsik-Peukert et al., 1997]. Demnach müßten Fibroblasten effizientere Proteine zur Reparatur des DNS-Schadens besitzen und könnten somit den Strahlenschaden schneller reparieren.

Periphere Lymphozyten reparieren strahleninduzierte DNS-Strangbrüche langsamer als proliferierende Zellen und stimulierte Lymphozyten [Boerrigter und Vijg, 1992; Chukhlovin et al., 1995; Kaminskas und Li, 1992; Tobi und Itzhaki, 1993], was zum Teil an der geringen Menge an Deoxyribonukleotiden [Green et al., 1996] und von einigen Reparaturenzymen [Tashiro et al., 1996] liegen könnte. Um zu zeigen, daß sich die in dem Versuch verwandten Fibroblasten im aktiven Zellzyklus, d.h.



Proliferationsstadium befanden, und deshalb den Schaden schneller reparieren konnten, müßte durch durchflußzytometrische Analyse das Zellzyklusstadium bestimmt werden. Trotz der Unterschiede im Ausmaß des DNS-Schadens nach Bestrahlung und der Reparaturkinetik zwischen Fibroblasten und Lymphozyten besteht eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Zellarten, wenn man die Tail Moment-Werte nach 5minütiger Reparatur einander gegenüberstellt ( $r = 0.65$ ;  $p = 0.0003$ ). Die Ergebnisse der Experimente zwischen Fibroblasten und Lymphozyten sind demzufolge miteinander vereinbar und nicht widersprüchlich. Die hohe Korrelation zwischen verschiedenen Zellen der gleichen Patientin bestärkt die Bedeutung genetischer Disposition für die Strahlenempfindlichkeit.

Die Korrelation zwischen der in vitro ermittelten Strahlenempfindlichkeit und der akuten Normalgewebsreaktion der Patientinnen ist bei Lymphozyten deutlicher als bei Fibroblasten, was Bedeutung hat hinsichtlich der Verwendung des Comet Assay als prädiktiver Test im klinischen Alltag. Lymphozyten können einfach und schnell aus einer Blutprobe isoliert und im Comet Assay analysiert werden, wohingegen Fibroblasten aus einer Hautbiopsie gewonnen und über einen längeren Zeitraum kultiviert werden müssen, bevor sie in ausreichender Zahl für den Test zur Verfügung stehen.

#### **4.4 Reproduzierbarkeit der Methode**

Um die Reproduzierbarkeit des Comet Assay zu überprüfen, wurden bei 10 Patientinnen die Lymphozytenversuche wiederholt. Die Ergebnisse der Wiederholungsexperimente kamen denen der Erstversuche sehr nahe. Zum statistischen Vergleich der 5-Minuten-Werte der zuerst durchgeführten Versuche und der zugehörigen Wiederholungen wurde der t-Test für paarige Stichproben angewendet, welcher keinen signifikanten Unterschied zeigte ( $p = 0,193$ ). Bei den Patientinnen 116, 117 und 118 ergaben die Wiederholungen abweichende Ergebnisse. Zu jedem Meßzeitpunkt wurden sehr hohe Werte ermittelt. Da die Resultate nach 5minütiger Reparatur jeweils um mehr als zwei Standardabweichungen höher als der entsprechende

Mittelwert aller Wiederholungsexperimente lagen, wurden sie bei dem statistischen Vergleich mit den Erstversuchen nicht berücksichtigt.

Hohe Meßwerte mit Lymphozyten erhielt man auch bei Patientin 104, obwohl hier klinisch keine starken Strahlennebenwirkungen festgestellt wurden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wäre ein Wiederholungsexperiment wünschenswert gewesen, das jedoch nicht möglich war, weil keine vergleichbare Probe mit vor Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten mehr zur Verfügung stand.

Durch genau definierte und konstante Versuchsbedingungen sowie angemessene Qualität der Zellen kann mit dem Comet Assay, wie hier gezeigt, eine gute Reproduzierbarkeit erreicht werden, was auch von anderen Autoren [Bauch T., 1996; Müller et al., 1994] bestätigt wird.

#### **4.5 Vergleich von vor und nach Bestrahlung gewonnenen Lymphozyten**

In den Fällen, in denen man Wiederholungsexperimente durchführte, wurden auch die nach Bestrahlung gewonnene Lymphozyten analysiert. Die Ergebnisse verglich man mit den Versuchsergebnissen von prätherapeutisch isolierten Zellen, um zu überprüfen, ob die Durchführung einer Strahlentherapie einen Einfluß auf das Ergebnis des Comet Assays besitzt. Die statistische Analyse mit den Werten nach 5minütiger Reparatur ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen vor und nach Bestrahlung gewonnen Lymphozyten ( $p = 0,338$ ). Zwar weisen die posttherapeutisch isolierten Zellen in einigen Fällen einen hohen Restschaden auf, ähnlich dem bei Lymphozyten strahlenempfindlicher Patientinnen, es besteht jedoch auch hier keine Signifikanz ( $p = 0,246$ ). Schlußfolgerung ist, daß die externe Bestrahlung eines Tumors im Bereich der Mamma die Radiosensitivität von peripheren Lymphozyten nicht bedeutend beeinflusst, oder aber, daß die Veränderungen so gering sind, daß sie mit dem Comet Assay nicht detektiert werden können. Möglicherweise wären die prä- und posttherapeutischen Ergebnisse an peripheren Lymphozyten anders bei Bestrahlung einer anderen Region mit höherem Blutfluß, wie z. B. im Bereich der großen Gefäße.

Die Lymphozyten der Patientinnen in Gruppe B wurden bis auf 141 alle nach Beginn der Bestrahlung gewonnen. Der signifikante Unterschied in DNS-Schädigung und

Reparatur zwischen Lymphozyten der Gruppen A und B kommt aber, wie das obige Resultat verdeutlicht, nicht durch den Zeitpunkt der Zellisolation und die bei B schon erfolgte Bestrahlung zustande. Die Lymphozyten der Patientinnen von A und B sind vergleichbar, da die externe Radiotherapie die Strahlenempfindlichkeit der Zellen nicht entscheidend veränderte, und die Unterschiede beruhen tatsächlich auf der bei den Patientinnen mit erhöhter akuter Strahlenreaktion auch auf zellulärer Ebene nachweisbaren erhöhten Radiosensitivität.

Seit Jahren versucht man, Methoden zur Einschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von Malignompatienten zu entwickeln. Ziel wäre eine optimale Dosisanpassung mit effizienter Tumorzerstörung bei minimalen Nebenwirkungen.

Die Daten aus der vorliegenden Untersuchung verdeutlichen, daß der Comet Assay eine zuverlässige und schnelle Methode zur Quantifizierung von DNS-Schäden und zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit ist. Man kann mit Hilfe dieses Tests klar zwischen Brustkrebspatientinnen mit akuten Hautreaktionen vom Grad 0-2 und strahlenempfindlichen Patientinnen, die starke frühe Normalgewebsnebenwirkungen vom Grad 3-4 aufweisen, unterscheiden. Eine besonders deutliche Korrelation zwischen experimentellen Ergebnissen und klinischem Bild ergibt sich bei Verwendung von Lymphozyten. Relevante Parameter sind vor allem Initialschaden und Restschaden nach 40minütiger Reparatur, nicht jedoch die Reparaturgeschwindigkeit.

Fibroblasten scheinen zur Bestimmung der akuten Strahlenempfindlichkeit von Tumorpatienten weniger gut geeignet zu sein. Durchschnittlich und überdurchschnittlich strahlenempfindliche Patienten sind nur im initialen DNS-Schaden klar voneinander zu unterscheiden. Desweiteren haben Fibroblasten den Nachteil, daß sie nicht gleich nach Probenentnahme für den Versuch zur Verfügung stehen, sondern sie für einige Wochen kultiviert werden müssen, bis sie in ausreichender Anzahl herangewachsen sind.

Im Hinblick auf den Einsatz des Comet Assay als prädiktiver Test zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben ist also die Verwendung von Lymphozyten sinnvoll, welche leicht aus einer Blutprobe isoliert und unmittelbar für den Test eingesetzt werden können. Die Ergebnisse liegen nach spätestens zwei Tagen vor. Anhand von Initial- und Restschaden ist es möglich, die individuelle akute Radiosensitivität abzuschätzen.

Neben der schnellen Durchführbarkeit weist der Comet Assay noch andere Vorteile auf. Durch Messung von DNS-Schaden und –Reparatur an einzelnen Zellen kann die Heterogenität einer Population untersucht und apoptotische oder nekrotische Zellen ausgeschlossen werden. Die zur Versuchsdurchführung erforderliche Zellzahl ist gering. Pro Objektträger wurden in der vorliegenden Arbeit ca. 15000 Zellen eingesetzt. Diese müssen sich nicht im Proliferationsstadium befinden, wie z. B. bei dem Mikronukleus-Test. Bei diesem kann die unterschiedliche Proliferationskapazität der Zellen verschiedener Spender Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung bereiten [Nachtrab et al., 1998].

Mit dem Comet Assay werden eine Vielzahl von radiogenen DNS-Schäden erfaßt. Andererseits können auch Schäden gemessen werden, die nicht durch ionisierende Strahlen entstanden sind. Der Test ist also sehr sensitiv, jedoch wenig spezifisch für Strahlenschäden. Das Ziel bei der Versuchsdurchführung zur Bestimmung individueller Strahlenempfindlichkeit muß also sein, nicht-radiogen entstehende DNS-Schäden auf ein Minimum zu reduzieren, indem man z. B. den Raum abdunkelt und damit die Einwirkung von UV-Licht verhindert. Zudem sollte auf eine schonende Isolation und Behandlung der Zellen vor dem Versuch geachtet werden.

Um eine Vergleichbarkeit der Resultate und eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, sind genau definierte und standardisierte Versuchsbedingungen erforderlich. Variationen bei Elektrophorese, Färbung und Analyse der Kometen haben entscheidenden Einfluß auf die Meßergebnisse.

Bei Berücksichtigung dieser Aspekte eignet sich der Comet Assay in hohem Maße zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit normaler Gewebe. Um die Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Resultate zu steigern, sollte er in Kombination z. B. mit dem Mikronukleus-Test angewendet werden. Beide Methoden messen die Quantität des DNS-Schadens, es kann jedoch keine Aussage über die Qualität der Reparatur getroffen werden. Man weiß also nicht, ob die Zellen nach Reparatur der Strangbrüche wieder voll funktionsfähig sind oder der Strahlenschaden fehlerhaft repariert wurde, was letztlich auch zum Zelluntergang führt. Die Qualität der DNS-Reparatur kann mit der FISH-Technik (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) erfaßt werden, welche neben Comet Assay und Mikrokern-Test den Wert eines prädiktiven Testsystems zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben noch steigern würde.

In dieser Arbeit wurde die Korrelation zwischen den Resultaten im Comet Assay und akuten Normalgewebsreaktionen bestimmt. Um die Frage zu beantworten, ob auch die späten Strahlennebenwirkungen mit dieser Methode erfaßt werden können, müssen die Patientinnen in einigen Jahren wieder einbestellt, auf Spätreaktionen wie Hautfibrose und –atrophie oder Teleangiektasien untersucht und die Resultate mit den im Comet Assay ermittelten Werten verglichen werden.

## 5 Zusammenfassung

Von der überwiegenden Zahl der Malignompatienten werden die in der Strahlentherapie angewandten Therapiemodalitäten (Fraktionierung und Gesamtdosis) gut toleriert. Dennoch werden immer wieder bei einzelnen Patienten akute Strahlennebenwirkungen sowie ausgeprägte Spätreaktionen der Haut und anderer Organe beobachtet. Untersuchungen in den vergangenen Jahren haben gezeigt, daß bei diesen Personen häufig eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit mit einer genetischen Komponente vorliegt. Besonders dramatisch ist dies für Tumorpatienten beschrieben worden, die an Ataxia telangiectatica (AT) erkrankt sind und eine Strahlentherapie erhalten haben.

Eine erhöhte Radiosensitivität kann auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Wichtiges Forschungsthema der letzten Jahre war die Entwicklung eines prädiktiven Testsystems zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit von Tumorpatienten im Vorfeld einer Strahlentherapie. Ziel ist eine individuelle Dosisanpassung mit möglichst effizienter Tumorzerstörung bei maximaler Schonung des Normalgewebes. Standardmethode zur Messung der zellulären Strahlenempfindlichkeit ist der Koloniebildungstest, der sich jedoch für eine prädiktive Testung nicht eignet, da es mehrere Wochen, wenn nicht Monate dauert, bis die Resultate vorliegen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Comet Assay als prädiktiver Test zur Erfassung der Strahlenempfindlichkeit normaler Gewebe geeignet ist. Dazu wurden bestrahlte Hautfibroblasten und periphere Blutlymphozyten von 30 Brustkrebspatientinnen im Comet Assay analysiert und die Resultate mit den akuten radiogenen Hautreaktionen der Patientinnen verglichen. Vor allem die Versuche mit Lymphozyten ergaben eine gute Korrelation zwischen initialem DNS-Schaden bzw. Schaden nach 40minütiger Reparatur und den klinisch beobachteten frühen Normalgewebsnebenwirkungen. Anhand der in vitro-Ergebnisse konnte klar zwischen durchschnittlich und überdurchschnittlich strahlenempfindlichen Patientinnen unterschieden werden. Bei den Fibroblasten waren die Patientinnen mit durchschnittlichen Reaktionen und die mit stärkeren radiogenen Nebenwirkungen nur im Initialschaden deutlich voneinander verschieden.

Der Comet Assay scheint demzufolge ein günstiger Test zu sein, um eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zu erfassen, vor allem wenn Lymphozyten aus dem peripheren Blut analysiert werden. Vorzüge des Comet Assay sind, daß die Resultate schon nach ein bis zwei Tagen vorliegen, einzelne Zellen untersucht werden können und nur wenige Zellen benötigt werden. Die Methode ist gut reproduzierbar, wie durch die Wiederholung von Lymphozytenversuchen gezeigt, wobei jedoch auf eine definierte und standardisierte Versuchsdurchführung geachtet werden muß.

Auch posttherapeutisch gewonnene Lymphozyten können zur retrospektiven Bestimmung der Radiosensitivität verwendet werden, da die externe Strahlentherapie der Mamma keinen detektierbaren Einfluß auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit zu haben scheint.

Mit dem Comet Assay ist es möglich, in kurzer Zeit mehrere Malignompatienten auf ihre Radiosensitivität hin zu untersuchen, wobei diese nur eine Blutprobe zur Lymphozytenisolation abgeben müssen. Im Hinblick auf die Anwendung als prädiktiver Test im klinischen Alltag ist die Kombination mit anderen Methoden wie z. B. dem Mikronukleus-Test und der FISH-Technik empfehlenswert, was die Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Resultate noch steigern würde.

## 6 Literaturverzeichnis

Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM and Moustacchi E (1999)

**Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients**

*Int J Cancer*, 24: 83-90

Appleby JM, Barber JBP, Levine E, Varley JM, Taylor AMR, Stankovic T, Heighway J, Warren C and Scott D (1997)

**Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy**

*Br J Cancer*, 76: 1546-1549

Bauch T (1996)

**Messung von DNA-Schäden und –Reparatur in Einzelzellen**

Inaug.-Diss, Universität – Gesamthochschule Essen

Begg AC, Russell NS, Knaken H and Lebesque JV (1993)

**Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy**

*Int J Radiat Biol*, 64: 393-405

Boerrigter METI and Vijg J (1992)

**Single-strand break disappearance in quiescent and phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes exposed to a single low dose of g radiation**

*Int J Radiat Biol*, 61: 95-101



Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J and Peters LJ (1995)  
**Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer**

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 32: 1371-1379

Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold Jr and Peacock JH (1994)  
**The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules**

*Radiother Oncol*, 33: 228-238

Chuklovin A, Dahm-Daphi J, Gercken G, Zander AR and Dikomey E (1995)  
**Comparative studies of induction and repair of DNA double-strand breaks in X-irradiated alveolar macrophages and resting peripheral blood lymphocytes using constant-field electrophoresis**

*Int J Radiat Biol*, 68:163-168

Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M and Oppitz U (1999)  
**Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay**

*Lab Invest*, 79: 699-705

Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ and West CML (1999)  
**Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters**

*Br J Cancer*, 79: 1366-1371

Fairbairn DW, Olive PL and O'Neill KL (1995)  
**The comet assay: a comprehensive review**

*Mutat Res*, 339: 37-59

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Sivon SS, Guttenberger R, Callender R, Malaise EP and Brock WA (1992)

**Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation**

*Cancer Res*, 52: 6348-6352

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL and Brock WA (1993)

**Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients**

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 27: 1173-1179

Green MH, Waugh AP, Lowe JE, Harcourt SA, Clingen PH, Cole J and Arlett CF (1996)

**Protective effect of deoxyribonucleosides on UV-irradiated human peripheral blood T-lymphocytes: possibilities for the selective killing of either cycling or non-cycling cells**

*Mutat Res*, 350: 239-246

Hu Q and Hill HP (1996)

**Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double strand-breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different dose rates**

*Radiat Res*, 146: 636-645

Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J and Overgaard M (1994)

**Evidence for a positive correlation between in vitro radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy**

*Int J Radiat Biol*, 66: 407-412

Kaminskas E and Li JC (1992)

**Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes**

*Mutat Res*, 274: 103-110

Kiltie AE, Orton JC, Ryan A, Roberts SA, Marples B, Davidson SE, Hunter RD, Margison G, West CML and Hendry JH (1997)

**A correlation between DNA damage and clonogenic measurements of radiosensitivity in fibroblasts from pre-radiotherapy cervix cancer patients**

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 39: 1137-1144

Kiltie AE, Ryan A, Swindell R, Barber JBP, West CML, Magee B and Hendry JH (1999)

**A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients**

*Radiother Oncol*, 51: 55-65

Marples B, Longhurst D, Eastham AM and West CML (1998)

**The ratio of initial / residual DNA damage predicts intrinsic radiosensitivity in seven cervix carcinoma cell lines**

*Br J Cancer*, 77: 1108-1114

Mitchell ELD and Scott D (1997)

**G<sub>2</sub> chromosomal radiosensitivity in fibroblasts of ataxia telangiectasia heterozygotes and a Li-Fraumeni syndrome patient with radioresistant cells**

*Int J Radiat Biol*, 72: 435-438

Müller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F and Böcker W (1994)

**Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines**

*Int J Radiat Biol*, 65: 315-319

Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M and Stopper H (1998)

**Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy**

*Int J Radiat Biol*, 73:279-287

Olive PL, Banath JP and Durand RE (1990)

**Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the 'comet' assay**

*Radiat Res*, 122: 86-94

Olive PL, Wlodek D and Babath JP (1991)

**DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis**

*Cancer Res*, 51: 4671-4676

Oppitz U, Bernthaler U, Schindler D, Sobeck A, Hoehn H, Platzer M, Rosenthal A und Flentje M (1999)

**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: 981-988

Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M and Stopper H (1999)

**Radiation-induced comet formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions**

*Strahlenther Onkol*, 175:341-346

Östling O and Johanson KJ (1984)

**Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells**

*Biochem Biophys Res Comm*, 123: 291-298

Ramsay J, Birrell G and Lavin M (1998)

**Testing for mutations of the ataxia telangiectasia gene in radiosensitive breast cancer patients**

*Radiother Oncol*, 47: 125-128

Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ and Flentje M (1997)

**In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer**

*Radiother Oncol*, 43: 181-188

Rydberg B and Johanson KJ (1978)

**Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells**

In *DNA Repair Mechanisms*, edited by Hanawalt PC, Friedberg EC and Fox CF (New York: Academic Press), pp. 465-468

Rydberg B (1984)

**Detection of DNA strand breaks in single cells using flow cytometry**

*Int J Radiat Biol*, 46: 521-527

Sarkaria JN, Bush C, Eady JJ, Peacock JH, Steel GG and Arnold JR (1998)

**Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts**

*Radiat Res*, 150: 17-22

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T and Sfez S (1995)

**A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3-kinase**

*Science*, 268: 1749-1753

Scott D, Hu Q and Roberts SA (1996)

**Dose-rate sparing for micronucleus induction in lymphocytes of controls and ataxia-telangiectasia heterozygotes exposed to  $^{60}\text{Co}$  g-irradiation in vitro**

*Int J Radiat Biol*, 70: 521-527

Shiloh Y (1995)

**Relationship of the ataxia-telangiectasia protein ATM to phosphoinositide-3-kinase**

*Trends Biochem Sci*, 20: 382-383

Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR and Schneider EL (1988)

**A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**

*Exp Cell Res*, 175: 184-191

Steffler C (1992)

**Is the micronucleus assay predictive for cellular radiosensitivity?**

*Brit J Radiol Suppl*, 24: 70-73

Steffler C (1997)

**Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben**

*Strahlenther Onkol*, 173: 462-468

Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D and Chase CL (1987)

**Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia**

*N Engl J Med*, 316: 1289-1294

Swift M, Morrell D, Massey RB and Chase CL (1991)

**Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia**

*N Engl J Med*, 325: 1831-1836

Tashiro S, Kotomura N, Shinohara A, Tanaka K, Ueda K and Kamada N (1996)

**S phase specific formation of the human Rad 51 protein nuclear foci in lymphocytes**

*Oncogene*, 12:2165-2170

Tchirkov A, Bay JO, Pernin D, Bignon YJ, Rio P, Grancho M, Kwiatkowski F, Giollant M, Malet P and Verrelle P (1997)

**Detection of heterozygous carriers of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene by G<sub>2</sub> phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes**

*Hum Genet*, 101: 312-316

Tobi SE and Itzhaki RF (1993)

**DNA double-strand breaks measured by pulsed-field electrophoresis in irradiated lymphocytes from normal humans and those with Alzheimer's disease**

*Int J Radiat Biol*, 63: 617-622

Virsik-Peuckert P, Rave-Frank M, Langebrake and Schmidberger H (1997)

**Differences in the yields of dicentrics and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals**

*Radiat Res*, 148: 209-215

Wurm R, Burnet NG, Duggal N, Yarnold JR and Peacock JH (1994)

**Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts**

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30: 625-633

Zhou PK, Sproston ARM, Marples B, West CML, Margison GP and Hendry JH (1998)

**The radiosensitivity of human fibroblast cell lines correlates with residual levels of DNA double-strand breaks**

*Radiother Oncol*, 47: 271-276

## 7 Anhang

### 7.1 Puffer und Lösungen für den Comet Assay

Lysepuffer: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% NaSacrosinat

Herstellung von 1 l Lysepuffer:      146,1 g NaCl  
   37,22 g EDTA  
   1,21 g Tris  
   10 g NaSacrosinat  
in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, pH 10 mit NaOH einstellen

Lyselösung: 89% Lysepuffer, 1% Triton X-100, 10% DMSO; unmittelbar vor Gebrauch herstellen

für 3 Küvetten benötigt man:      200,25 ml Lyselösung  
   2,25 ml Triton X-100  
   22,5 ml DMSO

#### Elektrophoresepuffer

Stammlösungen:                      5 M NaOH (200 g / 1 l),  
   200 mM EDTA mit pH10 (74,45 g / 1 l)

Gebrauchspuffer:                      300 mM NaOH; 1 mM EDTA

für 1 l benötigt man:                60 ml NaOH, 5 ml EDTA, 935 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, vor  
   Gebrauch herstellen

#### Neutralisationslösung:

Herstellung von 1 l:                0,4 M Tris mit pH 7,5  
   48,45 g Tris in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen, pH mit HCl (9%)  
   einstellen

#### Ethidiumbromid-Färbelösung

Stammlösung:                      1 mg / 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

Gebrauchslösung:                      20 µl Stammlösung, 980 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, filtrieren



<u>LMA 0,5%</u>	50 mg LMA, 10 ml PBS, aufkochen lassen
<u>HMA 0,75%</u>	375 mg HMA, 50 ml PBS, aufkochen lassen

## 7.2 Material

### 7.2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und stammten von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

### 7.2.2 Medien, Medienzusätze und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	D-6046, Sigma, Deisenhofen
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)	D-8537, Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	F-7524, Sigma, Deisenhofen
Glutamin 200mM	G-7513, Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Steptomycin, 10 000 IE/10 000 µg/ml	P-4333, Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640	R-8758, Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung, 0,05%/0,02%	T-3924, Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	T-8154, Sigma, Deisenhofen

### 7.2.3 Geräte

Autoklav	Melag Typ 28; Melag, Berlin
Bildanalysesystem	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
Brutschrank	Typ BB5060, Heraeus Instruments, Hanau
Elektrophoresekammer	Typ 20-10, Stratagene, Heidelberg
Feinwaage	SBA32, Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Fluoreszenzmikroskop	Leica, DMCB, Wetzlar
Grobwaage	LS 2000, Ohaus, Gießen

Kühlschrank	Profi-line; Liebherr, Schweinfurt
Linearbeschleuniger	SL 7514, Philips
Magnet-Heizrührer	Typ MR 3001, Heidolph Elektro GmbH, Keilheim
Mikrowelle	Quickchef; Moulinex, Köln
Netzgerät	Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger	Labcraft, Curtin Matheson Scientific, Inc., UK
PC	Macom
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim
Sterilbank	BHA 72, FASTER, München
Vortex	GLW – Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg
Wasserbad	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

#### **7.2.4 Glas- und Plastikmaterialien**

Plastikwaren für die Zellkultur	Becton Dickinson (Falcon) GmbH, Heidelberg; Nunc, Wiesbaden
Glaswaren	Firma Hartenstein, Würzburg; Noras, Würzburg

#### **7.3 Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AD	Axilladisektion
AT	Ataxia telangiectatica
ATM	Ataxia telangiectatica mutated protein
BET	Brusterhaltende Therapie

°C	Grad Celsius
cm, cm <sup>2</sup>	Zentimeter, Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GVGE	Graded Voltage Gelelektrophorese
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HS	Hypersensitiv
IU	Internationale Einheiten
mA	Milliampere
µg	Microgramm
mg	Milligramm
µl	Microliter
ml	Milliliter
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaSacrosinat	Natriumsacrosinat
n.s.	nicht signifikant
PC	Personalcomputer
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RTOG	Radiotherapy Oncology Group
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SSB	Einzelstrangbruch
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
V	Volt