



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Ist die variable Expressivität der Neurofibromatose Typ 1
bedingt durch interindividuelle Unterschiede in der
DNA-Reparaturkapazität der Patienten?

angestrebter akademischer Grad
Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Friederike Vera Betz
Matrikelnummer:	a0448503
Studienrichtung/Studienzweig:	Anthropologie
Betreuer:	Prof. Dr. Günter Assum, Universität Ulm

Wien, im Juli 2009

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Wien, im Juli 2009

Zusammenfassung

Bei der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) handelt es sich um eine autosomal-dominante Tumorerkrankung, welche in einem Verhältnis von 1:3.500 auftritt. Verursacht wird NF1 durch Mutationen des NF1 Gens, einem Tumorsuppressorgen, welches auf Chromosom 17 lokalisiert ist. NF1 ist vor allem durch das Auftreten zahlreicher Neurofibrome, café-au-lait Flecken und Lischknötchen gekennzeichnet. Jedes Neurofibrom resultiert dabei aus einer individuellen somatischen Mutation der verbleibenden Wildtypkopie des NF1 Gens in einer Schwannzelle.

Die Variabilität in der Anzahl an Neurofibromen unter den Patienten ist enorm und reicht von ein paar wenigen bis zu mehreren Hundert Neurofibromen. Demzufolge könnte die interindividuelle Variabilität in der Anzahl an Neurofibromen die interindividuelle Variabilität der somatischen Mutationsrate widerspiegeln, welche wiederum von Unterschieden in der DNA-Reparaturkapazität resultieren könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die DNA-Reparaturkapazität zahlreicher NF1 Patienten mit Hilfe verschiedener DNA-Reparaturtests untersucht.

Die DNA-Reparaturkapazität wurde mit dem Comet Assay an Fibroblastenkulturen, sowie dem Schwesterchromatidaustausch-Test, Mitotic Delay-Test und Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen gemessen.

Der Comet Assay misst den verbleibenden Schaden einer einzelnen Zelle, indem die Zellen auf einem mit Agarose beschichteten Objektträger einem elektrischen Feld ausgesetzt sind und somit aufgrund der Intensität der gewanderten chromosomalen DNA-Fragmente auf den Schaden der Zelle geschlossen werden kann.

Ein erhöhter DNA-Schaden wird außerdem durch eine steigende Anzahl an Schwesterchromatidaustauschen und Mikronuklei angezeigt, welche durch den SCE- bzw. MN-Test nachgewiesen werden können.

Der Mitotic Delay-Test misst hingegen die Zellzyklusverschiebung, die der Reparatur vorhandener DNA-Schäden dient um eine Weitergabe geschädigten Erbguts an die Tochterzellen zu verhindern.

Bei keinem der hier angewendeten Tests konnten signifikante Unterschiede zwischen verschieden stark betroffenen Patienten festgestellt werden.

Die Anzahl an Neurofibromen korrelierte in keinsten Weise mit den Ergebnissen der Reparaturtests, sodass die Hypothese der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominantly-inherited disorder, affecting 1:3500 worldwide. NF1 is caused by mutations in the NF1 gene, a tumor suppressor gene located on chromosome 17. NF1 is characterized by the occurrence of multiple dermal neurofibromas, café au lait spots and lisch nodules.

Each neurofibroma results from an individual somatic mutation in the wild type copy of the NF1 gene in a schwann cell.

The variability in the numbers of neurofibromas between different patients is enormous and reaches from only a few to hundreds of neurofibromas. Therefore the interindividual variability in the number of neurofibromas may reflect interindividual variability of somatic mutation rates which may result from interindividual differences in the DNA repair capacity.

To verify this hypothesis DNA repair efficiency of a number of NF1 patients was tested by different DNA repair tests. DNA repair capacity was tested by Comet Assay with fibroblasts, as well as Sister Chromatid Exchange Test, Mitotic Delay Test and Micronucleus Test with lymphocytes. The Comet Assay detects the remaining DNA damage of cells suspended in a thin agarose gel on a microscope slide after electrophoresis. The increased DNA damage of the cells is indicated by the increased migration of chromosomal DNA from the nucleus.

Increased DNA damage is also indicated by the increased number of SCEs and micronuclei, which can be detected by SCE and MN Test. The Mitotic Delay Test describes the delay of the cell cycle as the result of repair mechanisms at the cell cycle checkpoint before mitosis.

In none of these tests which were used to detect DNA repair efficiency, significant differences between different affected patients were found. Because there are no correlation between the number of neurofibromas and DNA repair capacity, this hypothesis couldn't be verified.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	l	Liter
Abb.	Abbildung	LMP	Niedrigschmelzpunkt (<i>low melting point</i>)
a. bidest	aqua bidestillata	LOH	Heterozygotieverlust (<i>loss of heterozygosity</i>)
BER	Basenexzisionsreparatur	M	molar
BNC	Binukleäre Zelle (<i>binucleated cell</i>)	m	milli
Bp	Basenpaar	m	meter
BPDE	Benzo[a]pyrene diol epoxide	μ	mikro
BRCA 1/2	Brustkrebs 1/2 (<i>Breast Cancer 1/2</i>)	MD	Mitotic Delay
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine	min	Minute
bzw.	beziehungsweise	MMR	Mismatch Reparatur
°C	Grad Celsius	MN	Mikronukleus
ca.	circa	MNT	Mikronukleus-Test
cm ²	Quadratzentimeter	M-Phase	Mitosephase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
Cs137	Caesium 137	n	nano
Cyt B	Cytochalasin B	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogen- phosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid	NaCl	Natrimchlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaOH	Natriumhydrxid
DNA	Disoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)	NER	Nukleotidexzisions- reparatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NF1	Neurofibromatose Typ 1
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)	NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-homologous end joining</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	PAK	Polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe
g	Gramm	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
GAP	GTPase aktivierendes Protein	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
GDP	Guanosindiphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
GRD	GAP verwandte Domäne (<i>GAP related domain</i>)	sec	Sekunde (<i>second</i>)
GTP	Guanosintriphosphat	SCE	Schwesterchromatid- austausch (<i>sister chromatid exchange</i>)
Gy	Gray	S-Phase	Synthese-Phase
h	Stunde (<i>hour</i>)	SSC	salziges Natriumzitat (<i>saline sodium citrate</i>)
H ₂ O	Wasser	TBq	Tera Becquerel
HCl	Salzsäure	Tris	Trishydroxymethyl- aminomethan
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektale Karzinom (<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)	UV	Ultraviolett
HR	Homologe Rekmbination	VD	Verdünnung
IR	Radioaktive Strahlung Irradiation radioactive		
Kb	Kilobase		
KCl	Kaliumchlorid		
kDa	kilo Dalton		
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Merkmale der NF1	2
1.1.3 NF1 Gen	3
1.1.4 Neurofibromin	4
1.1.5 Mutationsspektrum der NF1	5
1.2 DNA Reparatur	7
1.2.1 Veränderungen der DNA	7
1.2.2 DNA-Reparaturwege	8
1.2.3 DNA Reparaturkapazität	9
1.3 DNA-Reparatur und Krebsentstehung	10
1.4 Untersuchung der DNA Reparaturkapazität	11
1.4.1 Comet Assay	11
1.4.2 Schwesterchromatidaustausch-Test	12
1.4.3 Mitotic Delay-Test	13
1.4.4 Mikronukleus-Test	14
1.5 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Zellen und Blutkulturen	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Lösungen, Puffer, Kulturmedien	19
2.1.4 Reagenziensysteme	22
2.1.5 Laborgeräte	22
2.1.6 Hilfsmittel	23
2.1.7 Software	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.1.1 Auftauen von Zellen	24
2.2.1.2 Kultivierung der Zellen	24
2.2.1.3 Einfrieren von Zellen	25

2.2.2	Comet Assay an Fibroblastenkulturen.....	25
2.2.2.1	Theoretische Grundlagen.....	25
2.2.2.2	Vorbereitung der Objektträger.....	26
2.2.2.3	Vorbereitung der Zellen.....	26
2.2.2.4	Herstellung der Präparate	27
2.2.2.5	Alkalidenaturierung und Elektrophorese.....	27
2.2.2.6	Neutralisation der Präparate	28
2.2.2.7	Färbung und Mikroskopie	28
2.2.3	Schwesterchromatidaustausch-Test an Lymphozytenkulturen	29
2.2.3.1	Theoretische Grundlagen.....	29
2.2.3.2	Ansetzen der Kultur.....	30
2.2.3.3	Abbruch der Kultur.....	31
2.2.3.4	Herstellung der Präparate	31
2.2.3.5	Färbung und Eindeckung der Präparate	32
2.2.3.6	Auswertung.....	32
2.2.4	Mitotic Delay-Test an Lymphozytenkulturen	32
2.2.4.1	Theoretische Grundlagen.....	32
2.2.4.2	Ansetzen der Kultur.....	33
2.2.4.3	Abbruch der Kultur.....	34
2.2.4.4	Messung.....	34
2.2.4.5	Auswertung.....	35
2.2.5	Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen	36
2.2.5.1	Theoretische Grundlagen.....	36
2.2.5.2	Ansetzen der Kultur.....	37
2.2.5.3	Abbruch der Kultur.....	37
2.2.5.4	Herstellung der Präparate	38
2.2.5.5	Färbung und Eindeckung der Präparate	38
2.2.5.6	Auswertung.....	39
2.2.6	MNT mit BrdU-Nachweis an Fibroblastenkulturen.....	40
2.2.6.1	Theoretische Grundlagen.....	40
2.2.6.2	Ansetzen der Kultur.....	41
2.2.6.3	Abbruch der Kultur.....	41
2.2.6.4	Herstellung der Präparate	41
2.2.6.5	BrdU-Nachweis	42
2.2.6.6	Gegenfärbung der Präparate	42
2.2.6.7	Auswertung.....	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Zellen und Blutkulturen.....	45
3.2	Comet Assay.....	49
3.2.1	Etablierung	49
3.2.2	Vergleich zweier Patientengruppen.....	50
3.3	Schwesterchromatidaustausch-Test.....	54
3.3.1	Etablierung des SCE-Tests an Fibroblastenkulturen.....	54
3.3.2	SCE-Test an Lymphozytenkulturen	55

3.4	Mitotic Delay-Test.....	59
3.4.1	Etablierung des Mitotic Delay-Tests an Fibroblastenkulturen.....	59
3.4.2	Mitotic Delay-Test an Lymphozytenkulturen	59
3.5	Mikronukleus-Test	63
3.5.1	Etablierung des Mikronukleus-Tests an Fibroblastenkulturen.....	63
3.5.2	Modifikation des Mikronukleus-Tests	63
3.5.3	Proliferationsindex der Fibroblastenkulturen	66
3.5.4	Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen	69
3.6	Statistische Auswertung	74
3.6.1	Vergleich zweier Patientengruppen.....	74
3.6.2	Korrelation der Ergebnisse mit der Anzahl an Neurofibromen.....	77
3.6.3	Korrelation der Ergebnisse mit dem Alter.....	80
4	Diskussion.....	81
4.1	Untersuchung an Fibroblastenkulturen.....	82
4.2	DNA-Reparaturtests an Lymphozytenkulturen	83
4.3	Variabilität der NF1	87
4.4	Fazit	90
5	Literaturverzeichnis	91
6	Appendix	101
7	Curriculum vitae	105

1 Einleitung

1.1 Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

1.1.1 Definition

Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine erbliche Tumorerkrankung des peripheren Nervensystems, welche erstmals 1882 von dem Pathologen Friedrich D. von Recklinghausen beschrieben wurde ^[1] und dadurch auch unter dem Namen Morbus Recklinghausen bekannt ist. Preiser und Davenport entdeckten im Jahre 1918 ^[2], dass die Vererbung der Krankheit dem Muster eines autosomal-dominanten Erbgangs folgt, sodass Kinder eines betroffenen Elternteils mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % an NF1 erkranken. Die Erkrankung, welche eine vollständige Penetranz aufweist, tritt bei Neugeborenen im Verhältnis von 1:3.500 ^[3-5] auf, wobei Kinder beider Geschlechter gleichermaßen betroffen sind. Ursachen der Erkrankung sind Mutationen des NF1 Gens, welches auf Chromosom 17 lokalisiert ist. Neurofibromatose Typ 1 ist charakterisiert durch das Auftreten zahlreicher Neurofibrome, café-au-lait Flecken (Pigmentanomalien der Haut) und Lischknötchen, wobei die klinische Auswirkung unter den Patienten sehr unterschiedlich ausfallen kann.

1.1.2 Merkmale der NF1

Da sich die klinische Diagnose von NF1 aufgrund der großen Variabilität der Krankheit als sehr schwierig erwies, wurden im Jahre 1988 von den „National Institutes of Health“ (NIH) Kriterien zur Diagnose von NF1 festgelegt ^[6]. Demnach wird NF1 bei Patienten diagnostiziert die mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllen.

- Sechs oder mehr café-au-lait Flecken (Pigmentanomalien der Haut) mit einem Durchmesser von mehr als 5 mm bei Kindern bzw. einem Durchmesser von mehr als 15 mm bei Erwachsenen
- Zwei oder mehr Neurofibrome (kutan oder subkutan) oder ein plexiformes Neurofibrom
- „Freckling“ (Pigmentveränderung, Sommersprossenähnliche Verfärbung) in Achsel- und/oder Leistenregion
- optisches Gliom des Nervus opticus
- zwei oder mehr Lischknötchen (Irishamartome)
- eine ausgeprägte Knochenläsion, beispielsweise Keilbeinflügeldysplasie, Verbiegung langer Röhrenknochen und Pseudoarthrose
- Verwandter ersten Grades mit diagnostizierter NF1

Das Hauptmerkmal der Neurofibromatose Typ 1 ist das Auftreten gutartiger peripherer Nervenscheidentumoren, welche als Neurofibrome bezeichnet werden. Neurofibrome bestehen aus verschiedenen Zelltypen, eingebettet in eine extrazelluläre, kollagenreiche Matrix. Neben Fibroblasten, endothelartigen, perineurialen Zellen, sowie Lymphozyten und Mastzellen bestehen Neurofibrome mit 60 bis 80 % hauptsächlich aus Schwannzellen ^[7]. Diese Neurofibrome können kutan oder plexiform auftreten. Kutane Neurofibrome, sowie café-au-lait Flecken treten bei über 90 % der NF1 Patienten spätestens nach der Pubertät auf. Die Unterschiede in der Anzahl an Neurofibromen sind enorm und reichen von ein paar wenigen bis zu mehreren Hundert ^[8].

In einer Populationsstudie ^[9] konnten bei 30 % der betroffenen Patienten plexiforme Neurofibrome festgestellt werden. Plexiforme Neurofibrome wachsen vernetzt entlang großer Nervenbahnen und können knotenartig ausgebildet sein.

Das Risiko, entartete Tumoren zu entwickeln ist bei NF1 Patienten deutlich erhöht ^[10] und macht NF1 zu einer der häufigsten vererbten Tumorerkrankungen.

Maligne periphere Nervenscheidentumoren, kurz MPNST (engl.: malignant peripheral nerve sheath tumors) gehören zu den am häufigsten auftretenden malignen Entartungen bei NF1 Patienten ^[11]. Es handelt sich dabei um Neoplasien, deren Ursprung in einem peripheren Nerven liegen, wobei vor allem mittlere bis große Nerven davon betroffen sind.

Das klinische Bild der NF1 ist sehr komplex und kann von einer sehr milden Ausprägung des Phänotyps zu sehr stark betroffenen Fällen variieren. Die meisten Symptome, vor allem die Anzahl der Neurofibrome sind altersabhängig, sodass sich das Krankheitsbild der Betroffenen im Laufe der Jahre stark verändern kann ^[12].

1.1.3 NF1 Gen

Wie bereits erwähnt gelten als Ursache für die Krankheit Mutationen des NF1 Gens, dessen genauer Locus auf dem langen Arm des Chromosoms 17, an der Stelle 17q11.2 liegt (siehe Abb.1.1). Diese Mutationen können vererbt werden oder wie in 50 % der Fälle neu auftreten ^[5;13].

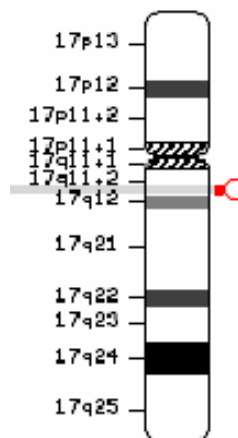


Abbildung 1.1: Lokalisation des NF1-Gens auf Chromosom 17

Nach erfolgter Genkartierung ^[14;15] konnte das NF1 Gen, sowie dessen Genprodukt Neurofibromin, durch positionelle Klonierung genauer charakterisiert werden ^[16-19]. Das NF1 Gen, welches ~350 Kb genomische DNA umspannt, besteht aus 61 Exons, unter denen sich acht alternativ gespleisste Exons befinden. Intron 1 mit einer Größe von 140 Kb nimmt den größten Teil ein.

1.1.4 Neurofibromin

Das Protein Neurofibromin hat eine Größe von ~2818 Aminosäuren, sowie eine Molekularmasse von 327-350 kDa ^[18;20]. Die genauen Funktionen des Proteins, sowie die Kenntnis darüber inwiefern Veränderungen des Neurofibromins die Krankheit verursachen, sind noch nicht vollständig geklärt.

Eine ~360 Kb große, zentral gelegene Domäne des Neurofibromins weist Sequenzhomologien mit der katalytischen Domäne Ras spezifischer GTPase-aktivierender Proteine (GAPs), beispielsweise p120-GAP auf ^[21;22]. Die GRD Domäne (engl.: GAP related domain) weist eine Ras-GAP Aktivität ^[23-25] auf und kann somit als negativer Regulator der Ras Onkogene angesehen werden. GAPs (engl.: GTPase-activating proteins) beschleunigen durch Abspaltung eines Phosphatrestes die Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP). GAPs dienen hauptsächlich dazu die Ras Aktivität negativ zu regulieren, indem sie das aktive an GTP gebundene Ras in das inaktive an GDP gebundene Ras umwandeln. Nachgewiesen werden kann Ras in GTP gebundener, aktiver Form hauptsächlich in Zelllinien maligner Tumoren mit hohen Proliferationsraten ohne funktionierendes Neurofibromin ^[26-28]. Bei Zellen mit inaktivem Neurofibromin konnten nach Wiederherstellung der GRD Domäne von NF1 eine Reduzierung von 16 bis 33 % der Ras Aktivität und eine um 53 % sinkende Proliferation der Zellen gemessen werden ^[29]. Ras spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen, welche entscheidend in der Zellproliferation und Zelltransformation sind. Da das Genprodukt Neurofibromin an der negativen Regulierung von Ras involviert ist, kann das NF1 Gen als klassisches Tumorsuppressorgen angesehen werden.

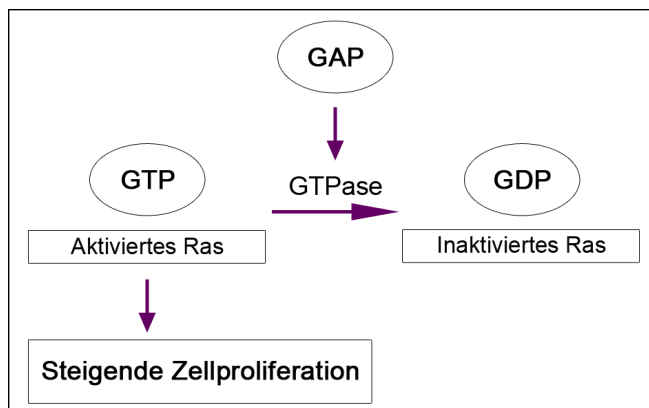


Abbildung 1.2: Rolle des Neurofibromins als GAP im Ras-Signalweg

1.1.5 Mutationsspektrum der NF1

Die Mutationen, welche die Krankheit auslösen, können sich über das gesamte NF1 Gen erstrecken. Das Mutationsspektrum der NF1 ist enorm groß. Wie bereits erwähnt erkranken rund 50 % der Betroffenen an Neumutationen, sodass NF1 eine sehr hohe Spontanmutation aufweist. Im Jahre 1999 wurde von dem „NF1 Mutation Analysis Consortium“ eine Datenbank mit über 255 verschiedenen Keimbahnmutationen des NF1 Gens veröffentlicht. In einer aktuelleren Studie ^[30] wurden die Mutationen von 1.770 nicht miteinander verwandten NF1 Patienten identifiziert. Dabei wurde versucht, die gesamte NF1 codierende Region durch einen RNA basierten Test zu analysieren. Des Weiteren wurde die veränderte cDNA (engl.: complementary DNA; synthetisiert aus mRNA) untersucht. Mikrodeletionen und intragenische Kopienanzahlveränderungen wurden ebenfalls identifiziert. Insgesamt wurden bei dieser Studie 1.017 unterschiedliche Keimbahnmutationen bei 1.770 Probanden, die nicht miteinander verwandt waren, identifiziert. Das sich aus dieser Studie ergebende Mutationsspektrum ist in Abb. 1.3 dargestellt.

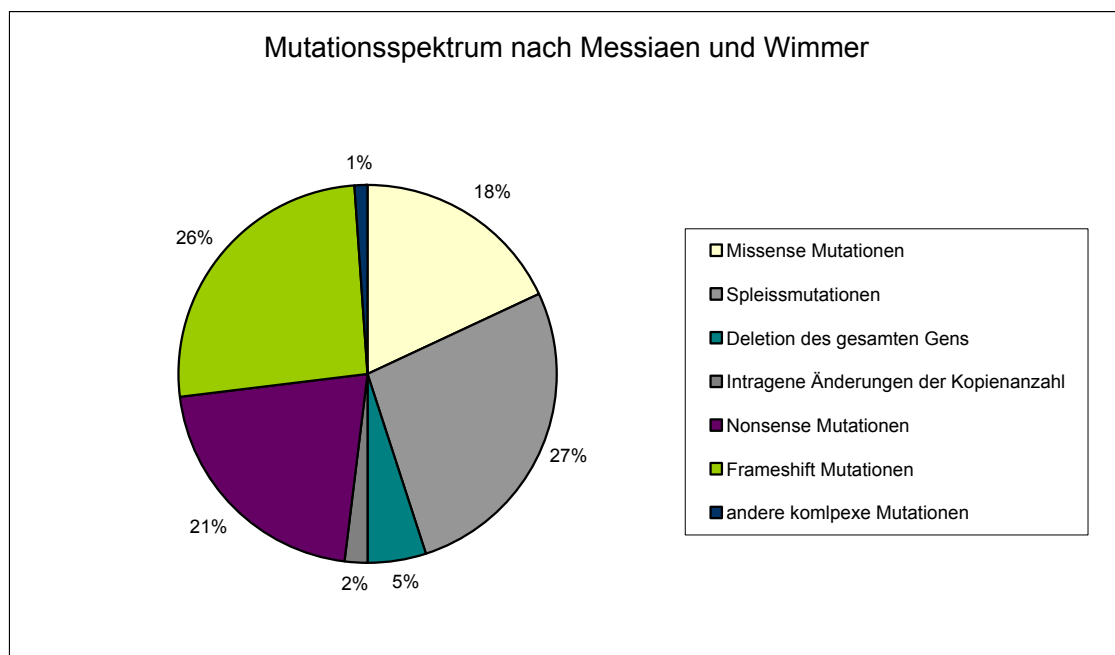


Abbildung 1.3: Mutationsspektrum nach Messiaen und Wimmer ^[30].

Die meisten dieser Mutationen traten vereinzelt auf, sodass beinahe in jeder betroffenen NF1 Familie eine eigene Keimbahnmutation nachgewiesen werden konnte. Zusammenhänge zwischen den Mutationen und der Ausprägung der Krankheit konnten nicht festgestellt werden. Es gibt also keine Genotyp/Phänotyp-Korrelation, die Vorhersagen über den weiteren Krankheitsverlauf zulassen würden ^[31;32].

Davon ausgenommen sind Deletionen, die das gesamte NF1 Gen betreffen. Dies tritt bei etwa 5 % aller Patienten auf, die aufgrund der großen Deletion auch schwerer von der Krankheit betroffen sind ^[33]. Patienten einer anderen, sehr selten beschriebenen Mutation, bei der 3 Bp des Exons 17 deletiert sind weisen hingegen sehr wenige bzw. gar keine Neurofibrome auf.

Bei dem NF1 Gen handelt es sich wie bereits erwähnt um ein Tumorsuppressorgen. Wie der Name schon sagt, zeichnen sich Tumorsuppressorgene durch Unterdrückung der Tumorentstehung aus, indem Sie trotz einem inaktiven Allel den Phänotyp erhalten können. Demnach müssen zur Entstehung von Tumoren beide Allele des Tumorsuppressorgens inaktiviert werden, sodass es zu einem totalen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens kommt. Diese Tumorentstehung folgt der „Two Hit Theorie“ nach Knudson, welche erstmals in Zusammenhang mit dem Retinoblastom beschrieben wurde ^[34]. Bei NF1 Patienten mit konstitutioneller Mutation ist bereits ein Allel des Gens inaktiviert. Ein Neurofibrom kann somit entstehen, wenn in einer Schwannzelle die verbleibende Wildtypkopie des NF1 Gens durch eine somatische Mutation inaktiviert wird. Laut dem „Zwei Treffer Modell“ nach Knudson, entspricht diese somatische Mutation dem so genannten Second Hit, also der zweiten Mutation und ist entscheidend für die Entstehung des Tumors. Bei dieser zweiten Mutation kann es sich sowohl um Punktmutationen, als auch um große Deletionen des NF1 Gens handeln. Große Deletionen und somatische Rekombinationsprozesse können zu einem Verlust der Wildtypkopie und in Folge dessen zum Verlust der Heterozygotie (LOH; engl.: loss of heterozygosity) am NF1 Locus führen ^[35-37]. Diese unterschiedlichen somatischen Mutationen können bei den jeweiligen NF1 Patienten gehäuft vorkommen ^[38;39]. Dieses Modell der Tumorentstehung konnte bei NF1 Patienten nachgewiesen werden, bei denen sowohl Keimbahnmutationen als auch somatische Mutationen identifiziert wurden. Jedes einzelne Neurofibrom entsteht aufgrund einer individuellen somatischen Mutation, sodass verschiedene Neurofibrome eines einzelnen Patienten aufgrund verschiedener somatischer NF1 Genmutationen entstanden sind.

Die Inaktivierung der Wildtypkopie durch eine zweite Mutation bewirkt einen unmittelbaren Verlust des Proteins Neurofibromin und kann sowohl in benignen als auch malignen Tumoren nachgewiesen werden. Da Neurofibromin an der negativen Regelung des Ras-Signalweges beteiligt ist, kommt es zu einer erhöhten Aktivität von Ras, wodurch die Zellproliferation beschleunigt wird.

Ein Neurofibrom kann also nur aufgrund einer somatischen Mutation in einer Schwannzelle entstehen ^[40], wobei bei den bisher analysierten Neurofibromen jeweils unterschiedliche somatische Mutationen identifiziert werden konnten.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die betroffenen Patienten äußerst stark in der Anzahl an Neurofibromen. Diese großen Unterschiede in der Anzahl an Neurofibromen sind auf eine unterschiedliche somatische Mutationsrate zurückzuführen, da Neurofibrome aufgrund einer zweiten somatischen Mutation in einer Schwannzelle entstehen. Die Unterschiede in der somatischen Mutationsrate stehen daher in unmittelbarem Zusammenhang mit der Entstehung der Neurofibrome. Die Ausprägung der NF1 in Bezug auf die Vererbung wurde an 175 NF1 Patienten untersucht. Die hohe Korrelation zwischen den dabei untersuchten monozygoten Zwillingspaaren deutete auf einen genetischen Zusammenhang hin ^[8]. Bisher unbekannte Gene könnten eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Neurofibromatose Typ 1 spielen.

Diese Unterschiede der somatischen Mutationsraten und somit der individuellen Anzahl an Neurofibromen könnte in Zusammenhang mit Unterschieden in der individuellen DNA-Reparaturkapazität stehen. Daher könnte das Krankheitsbild der NF1 in der interindividuellen DNA-Reparaturkapazität der einzelnen Patienten begründet sein.

1.2 DNA Reparatur

1.2.1 Veränderungen der DNA

Schädigungen der DNA treten im Verlauf der Replikation spontan auf, können jedoch auch aufgrund äußerer Einflüsse hervorgerufen werden. UV-Strahlung beispielsweise kann die DNA aufgrund der Bildung von Thymin-Dimeren auf direktem Wege schädigen, wodurch die Reparatur des Schadens zur Entstehung von Mutationen im

Erbgut führen kann. DNA-Schäden können auch aufgrund verschiedener Stoffwechselvorgänge im Körper entstehen, bei denen es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen, beispielsweise Sauerstoffradikalen kommen kann. Des Weiteren können DNA-Schäden aufgrund der Einwirkung mutagener Substanzen entstehen. Bei den DNA-Schäden handelt es sich meist um Basenschäden, DNA-Protein Vernetzungen, Bildungen von Dimeren, sowie Einzel- und Doppelstrangbrüchen.

1.2.2 DNA-Reparaturwege

DNA-Reparaturmechanismen haben für die Stabilität des Genoms eine sehr große Bedeutung, indem sie schadhafte Veränderungen der DNA-Struktur in einer Zelle reparieren. Ein fehlerfreier Ablauf der Replikation und Transkription wird durch verschiedene enzymatisch gesteuerte Prozesse in der Zelle gewährleistet, welche DNA-Schäden erkennen und beseitigen können. Die Veränderungen der DNA-Struktur können auf unterschiedliche Weise repariert werden. Dabei unterscheidet man die direkte Reparatur durch Aufhebung des Schadens, die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die homologe Rekombination (HR), nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ; engl.: Non-homologous end joining) und die Mismatch Reparatur (MMR) ^[41;42]. Sowohl bei der Basenexzisionsreparatur (BER), als auch bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden Veränderungen der DNA erkannt und durch spezielle enzymatische Prozesse entfernt und regeneriert. Die Mismatch Reparatur ist für das Erkennen von Basenfehlpaarungen verantwortlich und nimmt somit eine Korrekturlesefunktion ein, indem der neu synthetisierte mit dem ursprünglichen Strang abgeglichen wird. Von Großer Bedeutung für die Stabilität des menschlichen Genoms ist die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche durch die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) ^[43;44]. Nicht reparierte Doppelstrangbrüche können in den Tochterzellen zu enormen Deletionen und als Folge dessen zum Verlust der Heterozygotie führen. Des Weiteren besteht die Gefahr von Translokationen oder gar Chromosomenverlusten ^[45]. Das Prinzip des NHEJ beruht auf der Verknüpfung der DNA-Doppelstrangbruch Enden. Die Verknüpfung der beiden Enden erfolgt in drei Schritten. Die beiden Enden werden zueinander ausgerichtet und dementsprechend durch Hinzufügen oder Entfernen von Nukleotiden modifiziert, um anschließend ligiert werden zu können.

Bei der homologen Rekombination werden zur Reparatur homologe DNA-Sequenzen benötigt, welche als Vorlage verwendet werden. Aus diesem Grund findet die homologe Rekombination vor allem in der G2-Phase des Zellzyklus statt, da in dieser Phase ausreichend homologe Sequenzinformationen der Schwesterchromatiden zur Verfügung stehen.

Die unterschiedlichen Reparaturmechanismen können, da sie sich in manchen Bereichen überlappen bzw. sich ergänzen als gut funktionierendes Netzwerk angesehen werden. So gibt es beispielsweise DNA-Schäden, die von mehreren Mechanismen korrigiert werden können ^[46]. Eine besonders wichtige Aufgabe bei der DNA-Reparatur übernehmen die Kontrollen des Zellzyklus. An diesen Kontrollpunkten wird im Falle eines detektierten Schadens der Zellzyklus gestoppt und die Reparaturgene aktiviert, sodass die Zelle ausreichend Zeit hat den Schaden zu beheben. Welcher Reparaturmechanismus letztendlich wann zum Einsatz kommt, wird von mehreren Faktoren wie zum Beispiel Zelltyp und Phase des Zellzyklus beeinflusst.

Laufen diese Reparaturmechanismen nicht fehlerfrei ab, kann es zu Mutationen kommen, welche die Ausbildung verschiedener Krankheiten zur Folge haben. Bei der Krankheit Xeroderma Pigmentosum beispielsweise können durch UV-Strahlung entstandene DNA-Schäden nicht repariert werden, sodass es im frühen Kindesalter zur Entstehung von Hautkrebs kommen kann. Als weiteres Beispiel ist das Hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC; engl.: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer) zu nennen, welches durch autosomal dominante Vererbung eines Gendefekts der DNA Mismatch Reparaturgene ausgelöst wird ^[47;48].

1.2.3 DNA Reparaturkapazität

Die individuelle, körpereigene DNA-Reparaturkapazität eines Menschen kann sich stark von der anderer Menschen unterscheiden. Die vielen Gene, die in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind können unterschiedlich ausgeprägt sein, sodass jeder Mensch eine unterschiedliche Variante an Reparaturgenen mit sich trägt. Basierend auf diesen Unterschieden bezüglich des zur Verfügung stehenden Spektrums an DNA-Reparaturgenen, reagiert jeder Mensch unterschiedlich auf Schädigungen seines Erbgutes. Die individuelle Reparaturkapazität kann anhand verschiedener Reparaturtests, auf die später genauer eingegangen werden soll, ermittelt werden. Diese unterschiedlichen DNA-Reparaturkapazitäten stehen in Zusammenhang mit

verschiedenen Krankheiten ^[49]. So konnte beispielsweise in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass Krebspatienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen im Durchschnitt geringere DNA-Reparaturkapazitäten aufweisen ^[50]. Im Unterschied zu den Patienten die aufgrund einer bestimmten Mutation der Mismatch Reparaturgene an HNPCC erkranken, weisen Krebspatienten bei denen eine geringere DNA-Reparaturkapazität nachgewiesen werden konnte keine speziellen Mutationen der DNA-Reparaturgene auf. Dieser Effekt wird allein durch die individuellen Varianten der Reparaturgene hervorgerufen.

1.3 DNA-Reparatur und Krebsentstehung

Bei Mutationen und Fehlfunktionen der DNA-Reparaturmechanismen kann es zur Entstehung von Krankheiten, vor allem aber zur Entstehung von Krebs kommen. Dies wurde bereits kurz am Beispiel der Krankheiten Xeroderma Pigmentosum und HNPCC beschrieben, welche aufgrund von Mutationen in den DNA-Reparaturgenen entstehen. In diesem Fall handelt es sich um konkrete Mutationen eines bestimmten Gens.

Auch bei der Entstehung des Mammakarzinoms nehmen DNA-Reparaturmechanismen eine entscheidende Funktion ein. Es ist bekannt, dass Träger einer Mutation in den Genen BRCA1 und BRCA2 ein deutlich höheres Risiko haben an Brustkrebs zu erkranken. Das Risiko an dieser Form Krebs zu erkranken erhöht sich jedoch zusätzlich durch Fehler in der Kontrolle des Zellzyklus und der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche. Dies ist wiederum auf einen Defekt verschiedenster Gene zurückzuführen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Es konnten bereits in mehreren Studien sporadische Brustkrebsfälle mit Variationen der DNA-Reparaturgene, sowie der Kontrolle des Zellzyklus assoziiert werden ^[51]. BRCA1 und BRCA2 tragen sowohl zur Erkennung als auch zur Antwort auf DNA Schäden, vor allem Doppelstrangbrüchen bei ^[52;53]. BRCA1 bindet an Rad51 ^[54-56] und andere Proteine und ist dadurch in verschiedene Signalwege ^[57-59] involviert, die unter anderem die Zellzykluskontrolle steuern. Embryonale Stammzellen mit fehlendem BRCA1 beispielsweise weisen einen Defekt in der homologen Rekombination der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur auf ^[60].

Das Nijmegen Breakage Syndrom, Ataxia telangiectasia und die Fanconie Anämie sind ebenfalls Krankheiten, die aufgrund homozygoter Mutation in Reparaturgenen entstanden sind und ebenfalls mit einem erhöhten Krebsrisiko in Zusammenhang stehen. Bei Behandlung mit ionisierender Strahlung, zeigen vor allem Zellen dieser Patienten eine erhöhte Mutagensensitivität. Die daraufhin entstehenden Läsionen und vor allem DNA-Doppelstrangbrüche führen bei nicht adäquater Reparatur zu Chromosomenaberrationen ^[61].

Liegen Mutationen der DNA-Reparaturgene vor, so führen diese mit einer hohen Penetranz zur Ausbildung verschiedener Krankheiten und in Folge dessen zur Entstehung von Tumoren. Im Gegensatz dazu stehen Normvarianten der DNA-Reparaturgene, welche mit einer deutlich niedrigeren Penetranz zu Tumoren führen können.

Mutationen der Mismatch Reparaturgene wurden bereits mehrfach mit Neurofibromatose Typ 1 in Zusammenhang gebracht. Beinahe alle Patienten mit einer Mutation beider Allele eines Mismatch Reparaturgens, weisen einige Merkmale der NF1 Patienten, wie beispielsweise café-au-lait Flecken auf ^[62;63]. Diese Patienten erfüllen in vielen Fällen die Kriterien zur Diagnose von NF1 ^[6], jedoch konnte bisher bei keinem dieser Patienten mit einem konstitutionellen Mismatch Reparaturgenedefizit eine NF1 Keimbahnmutation nachgewiesen werden ^[64-67]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass NF1 als Ziel für Mutationen der Mismatch Reparaturgene angesehen werden kann ^[68;69].

1.4 Untersuchung der DNA Reparaturkapazität

Die individuelle DNA-Reparaturkapazität wurde mit Hilfe unterschiedlicher Reparaturtests gemessen, welche im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

1.4.1 Comet Assay

Der Comet Assay Test, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt ist ein Genotoxizitätstest auf Einzelzellniveau ^[70]. Er ist schnell und einfach durchzuführen und kann in der Praxis vielseitig angewendet werden ^[71-73].

In der alkalischen Version ($> \text{pH } 13$) eignet er sich zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen, DNA-Doppelstrangbrüchen, sowie alkalilabilen Stellen. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass die auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger aufgetragenen Zellen, einem elektrischen Feld ausgesetzt werden, woraufhin geschädigte Chromosomenstücke den Kern in Richtung Anode verlassen. Die Intensität und Länge der Migration schadhafter DNA-Fragmente ist ein Maß für den Schaden jeder einzelnen Zelle. Je größer der Schaden einer Zelle, desto mehr DNA-Fragmente verlassen während der Elektrophorese den Zellkern in Richtung Pluspol. Der Comet Assay Test erlaubt somit die Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität, indem die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schadensinduktion durch ionisierende Strahlung auf die Objektträger aufgebracht werden. Dies ermöglicht einen anschließenden Vergleich der verbleibenden DNA-Schäden aufgrund der gewanderten DNA-Fragmente nach unterschiedlichen Reparaturzeiten. Als Maß wird das Tail Moment (Produkt aus Intensität und Länge der gewanderten Bruchstücke) herangezogen, sodass verschiedene Zelllinien hinsichtlich Ihrer individuellen DNA-Reparaturkapazität miteinander verglichen werden können.

1.4.2 Schwesterchromatidaustausch-Test

Dieser Indikator-test dient dem Nachweis genotoxischer Effekte in Form von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs; engl.: Sister Chromatid Exchanges). Unter SCEs versteht man reziproke Austausche zwischen DNA-Abschnitten eines sich replizierenden Chromosoms ^[74], welche ein Anzeichen für den genotoxischen Schaden einer Zelle darstellen. Da der Austausch an identischen Schwesterchromatiden stattfindet kommt es zu keinem Informationsaustausch. Voraussetzung zur Darstellung der SCEs ist eine differentielle Markierung der beiden Schwesterchromatiden, welche durch Einbau des Basenanalogs BrdU und einer speziellen Färbung erreicht werden kann ^[75;76]. Der SCE-Test kann als Indikator für mutagene Effekte herangezogen werden und dient daher als Marker für DNA-Schäden einer Zelle ^[77]. Durch BPDE (Benzo[a]pyrene diol epoxide) induzierte Zellen weisen eine deutlich höhere SCE Häufigkeit auf, die mit steigender BPDE Konzentration zunimmt ^[78]. Es gibt Hinweise darauf, dass durch BPDE hervorgerufene DNA-Schäden, vor allem DNA-Addukte, durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Basenexzisionsreparatur (BER)

behooben werden können ^[79]. Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung von SCEs führen sind nicht bekannt.

1.4.3 Mitotic Delay-Test

Dieser Zellzyklusverschiebungstest dient dem Nachweis von DNA-Reparaturvorgängen und beruht auf dem Prinzip, dass die Reparatur von DNA-Schäden zu einem Anhalten des Zellzyklus führt ^[80]. Zwischen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind Kontrollpunkte vorhanden, welche den Zustand der Zelle kontrollieren und im Falle der Detektion eines DNA-Schadens den Zellzyklus stoppen können. Durch Arretierung des Zellzyklus können nun verschiedene DNA-Reparaturvorgänge oder auch die Apoptose der Zelle eingeleitet werden ^[81]. Dieser Zellzyklusarrest kann in Abhängigkeit des DNA-Schadens bzw. der Reparaturkapazität zeitlich variieren ^[82;83] und kann mit Hilfe der Flowcytometrie quantitativ erfasst werden. Dabei wird die jeweilige Anzahl an Zellen der verschiedenen Zellzyklusphasen einer induzierten und spontanen Probe gemessen, wodurch die Verschiebung des Zellzyklus errechnet werden kann. Dabei findet je nach Verzögerung der Mitose eine Anhäufung der Zellen in der G2-Phase statt. Hier befinden sich zusätzlich zu den Zellen die Ihre S-Phase abgeschlossen haben, jene Zellen die dabei sind einen detektierten Schaden zu reparieren. Diese Zellen arretieren am Übergang der G2- zur M-Phase, an dem mittels homologer Rekombination eine Weitergabe des geschädigten Erbguts an die Tochterzellen verhindert wird. Dieser Kontrollpunkt stellt für die Zelle die letzte Möglichkeit dar, Schäden vor der Zellteilung zu reparieren. Der Mitotic Delay Index ergibt sich daher aus dem Verhältnis der Zellen aus der G2- und S-Phase der durch ionisierende Strahlung induzierten Probe gegenüber einer unbehandelten Kontrolle. Ein Ausfall eines DNA-Reparaturgens, welches an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, kann enorme Folgen haben. So können beispielsweise wichtige Funktionen der Kontrollpunkte ausfallen, sodass kein Zellzyklusarrest eingeleitet wird und daher geschädigtes Erbgut synthetisiert und an die Tochterzellen weitergegeben wird. Ein derartiger Ausfall wäre bei diesem Test durch einen extrem niedrigen MD Index gekennzeichnet, da die Zellen aufgrund des defekten Kontrollpunktes keinen Zellzyklusarrest und daher keine Reparatur durchlaufen würden.

1.4.4 Mikronukleus-Test

Der Mikronukleus-Test ist ein Mutagenitätstest, welcher sich zum Nachweis chromosomaler Schäden eignet ^[84;85], jedoch auch zum Nachweis der DNA-Reparaturkapazität verwendet werden kann. Das Prinzip des Tests beruht auf dem Nachweis von Chromosomenschäden, welche in Form von Mikronuklei aus einer sich teilenden Zelle hervorgehen. Diese chromatinhaltigen Mikronuklei werden im Plasma durch eine eigene Kernmembran umhüllt ^[86] und erscheinen neben den regulären Tochterzellkernen als zusätzlicher Zellkern. Nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche führen zu Chromosomenbrüchen, welche während der Mitose aufgrund des fehlenden Zentromers nicht vom Spindelapparat erfasst werden können und daher als Bruchstücke im Zytoplasma als Mikrokerne erscheinen. Durch die Zugabe von Cytochalasin B wird die Zytokinese blockiert, wodurch die Zellteilung jedoch nicht die Kernteilung verhindert wird ^[87]. Dadurch können ausschließlich Mikronuklei binukleärer Zellen ausgezählt werden ^[88;89], die nach Zugabe von Cytochalasin B genau eine Mitose durchlaufen haben. Fügt man den Zellen nun einen definierten Schaden durch ionisierende Strahlung zu, so kann man nach geeigneter Inkubationszeit durch Auszählen der Mikrokerne auf den verbleibenden DNA-Schaden und somit auf die DNA-Reparaturkapazität schließen. Dabei nimmt die Anzahl an Mikronuklei mit der Dosis der ionisierenden Strahlung linear zu ^[90]. Durch Auszählung der Mikronuklei mit einem automatisierten Bildanalysesystem, anstelle einer manuellen Auswertung, steigt die Genauigkeit, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an ^[91-93]. Zahlreiche Studien konnten bereits Zusammenhänge zwischen einer erhöhten Mikronukleus-Häufigkeit und der Entstehung von Krebs nachweisen ^[94-96].

1.5 Fragestellung

Das Krankheitsbild der NF 1 und deren Symptome weisen unter den NF1 Patienten eine sehr hohe Variabilität auf. Vor allem die Anzahl an auftretenden Neurofibromen, einem Hauptmerkmal der NF1 reicht von ein paar wenigen bis zu mehreren Hundert. Neurofibrome entstehen aufgrund einer somatischen Mutation in einer Schwannzelle, wodurch die zuvor vorhandene Wildtypkopie des NF1 Gens inaktiviert wird (Zwei Treffer Modell nach Knudson). Jedes Neurofibrom entsteht daher aufgrund einer individuellen somatischen Mutation, sodass verschiedene Neurofibrome eines Patienten auch verschiedene somatische Genmutationen tragen können. Das Spektrum der konstitutionellen Mutationen ist sehr groß, beinahe alle betroffenen NF1 Familien verfügen über typische Mutationen, welche über das gesamte NF1 Gen verstreut sein können. Die Art der Mutation lässt keine Rückschlüsse auf das Krankheitsbild der betroffenen Person zu. Eine Ausnahme bilden Personen, die eine Deletion des gesamten NF1 Gens aufweisen und meist stark von der Krankheit betroffen sind.

Es gibt bisher keine Hinweise, welche Mechanismen für diese große Variabilität verantwortlich sein könnten. Es wäre denkbar, dass diese Variabilität durch interindividuelle Schwankungen der somatischen Mutationsrate der einzelnen Patienten hervorgerufen wird. Auslöser dieser Schwankungen in der Mutationsrate könnten wiederum interindividuelle Unterschiede in der körpereigenen individuellen DNA-Reparaturkapazität der einzelnen Patienten sein. Es ist bekannt, dass Menschen sich in Ihrer DNA-Reparaturkapazität unterscheiden und daher DNA-Schäden unterschiedlich effektiv repariert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht die Reparaturkapazitäten verschieden stark betroffener NF1 Patienten zu untersuchen. Die individuelle DNA-Reparaturkapazität wurde anhand verschiedener Reparaturtests bestimmt, welche unterschiedliche Aspekte der DNA-Reparatur widerspiegeln, da die Endpunkte der DNA-Reparatur dieser Tests relativ weit auseinander lagen. Die ausgewählten Tests waren unabhängig voneinander, wodurch ein recht großes Gesamtspektrum der untersuchten DNA-Reparaturkapazität entstand.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Blutkulturen

Die Tests wurden unter Verwendung von Fibroblasten- und Lymphozytenkulturen verschiedener NF1 Patienten durchgeführt.

Die genaue Beschreibung der zur Verfügung stehenden Kulturen ist im Ergebnisteil in Kapitel 3.1 nachzulesen.

2.1.2 Chemikalien

Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose LMP, Sea plaque, GTG	Biozym, Hameln
Aqua DeltaSelect Spüllösung	DeltaSelect, Pfullingen
Benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE)	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cleaning Solution for Flow Systems	Partec, Münster
Colcemid 10 µg/ml	Biochrom AG, Berlin
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

DAPI (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid	
DAPI staining solution	Partec, Münster
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
DMEM (10 x)	Biochrom AG, Berlin
EDTA (Versen)	Biochrom AG, Berlin
Essigsäure (100 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eukitt	Kindler, Freiburg
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin 10 mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
10 x HBSS ohne NaHCO_3	PANBiotech, Aidenbach
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	BDH & Prolabo, VWR Int.
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	B. Braun AG, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Phytohämagglutinin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-1640 (L-Glutamine, 25 mM Hepes)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trizma® base (Tris) 99,9 % titration	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Vectashield®	Vector Lab., Burlingame, CA
Xylol Isomerengemisch	BDH & Prolabo, VWR Int.

2.1.3 Lösungen, Puffer, Kulturmedien

Agarose für Objektträger	1,5 % Agarose in 10 x PBS
Alkalischer Elektrophoresepuffer (pH > 13)	30 ml 10 M NaOH
Leitfähigkeit: 60-65 mS/cm	5 ml 200 mM EDTA ad 1 l a. bidest
BrdU-Stammlösung	5 mg/ml in 1x Hanks
Cytochalasin B-Lösung	5 mg Cytochalasin B 10 ml DMSO
DMEM	400 ml Viapur 5 ml NEA acids 4 ml Na Pyruvat Lösung 5 ml Penicillin/Streptomycin 20 ml NaHCO ₃ (7,5 %) 40 ml DMEM + 50 ml FCS + 13 ml L-Glutamin
DAPI-Färbelösung	15 µl DAPI (1 µg/ml) in 100 ml 4 x SSC
Ethidiumbromid-Färbelösung	10 µg/ml in a. bidest
Fixativ I (MNT)	5 Teile Methanol 1 Teil Essigsäure 6 Teile NaCl (0,9 %)
Fixativ II (MNT)	5 Teile Methanol 1 Teil Eisessig

Fixativ S (SCE)	3 Teile Methanol 1 Teil Essigsäure
Giemsa-Färbelösung	5 ml 0,33 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5 ml 0,33 M KH_2PO_4 ad 92 ml a. bidest 8 ml Giemsa (filtriert)
1 x Hanks	50 ml 10 x HBSS 2,35 ml NaHCO_3 (7,5 %) ad 500 ml a. bidest
Ibraimov-Lösung	92 ml a. bidest 5 ml Essigsäure 3 ml Methanol
KCl-Lösung (0,4 %)	2 g KCl ad 500 ml a. bidest
KCl-Lösung (0,56 %)	2,8 g KCl ad 500 ml a. bidest
LMP-Agarose	0,5 % LMP-Agarose in 10x PBS
Lyse-Lösung (pH 10)	2,5 M NaCl 100 mM NaEDTA 10 mM Tris frisch zugeben: 1 % Triton X-100 10 % DMSO
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) 7,5 %	37,5 g NaHCO_3 ad 500 ml a. bidest

Neutralisationspuffer (pH 7,5)	0,4 M Tris HCL (37 %) ad pH 10
10 x PBS	47,75 g PBS ad 500 ml a. bidest sterilfiltriert
Proteinase K	10 mg/ml in TE
RPMI-Kulturmedium	100 ml RPMI 20 ml FCS 1,2 ml PHA 1,2 Gentamycin (1 %)
Sörensenpuffer Lösung A	0,33 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Sörensenpuffer Lösung B	0,33 M KH_2PO_4
Sörensenpuffer (pH 6,8)	5 ml Sörensenpuffer Lösung A 5 ml Sörensenpuffer Lösung B ad 100 ml a. bidest
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat HCl ad pH 7,0
Trypsin-EDTA (0,15 %)	43 ml 10 x PBS 30 ml 2,5 % Trypsin 40 ml 1 % EDTA ad 500 ml H_2O + 7,5 ml NaHCO_3 (7,5 %)

2.1.4 Reagenziensysteme

5-Bromo-2'-deoxyuridine
Labeling and Detection Kit I

Roche, Penzberg

2.1.5 Laborgeräte

AL Cellcounter Modell 871
Digestorium
Elektrophoresekammer SUB CELL® GT
Flowcytometer CCA
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging
mit CCD Kamera
Fluoreszenzmikroskop Axioplan
mit AxioCam MRm
Fluoreszenzmikroskop Axiophot
mit Cohu High Performance CCD Kamera
Labofuge 400
Lichtmikroskop
Microcomputer Electrophoresis Power Supply
Consort E 425
Megafuge 1.0 R
Strahlungsquelle Gammacell 2000
44,8 TBq am 30.01.2007
Thermomixer 5436
Uniflow UVUB 1200
Wasserbad GFL

Brutschrank Heraeus 6000 (37 °C, 5 % CO₂)
Brutschrank Heraeus (37 °C)

AL Systeme, Karlsruhe
w.r.t. Laborbau, Stadtlonn
Bio-Rad, München
Partec, Görlitz
Carl Zeiss, Oberkochen

Carl Zeiss, Oberkochen

Carl Zeiss, Oberkochen

Heraeus Instruments, Hanau
Carl Zeiss, Oberkochen
Fröbel Labortechnik, Lindau

Heraeus Instruments, Hanau
Molsgaard Medical,
Heorsholm, DK
Eppendorf, Hamburg
Nunc, Wiesbaden
Gesellschaft für Labortechnik
mbH, Burgwedel

Heraeus Instruments, Hanau
Heraeus Instruments, Hanau

2.1.6 Hilfsmittel

Deckgläser (24 mm x 60 mm)	Menzel, Braunschweig
Flachbodenröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Immersol™ 518 F	Carl Zeiss, Oberkochen
Objektträger (76 mm x 26 mm x 1mm)	Menzel, Braunschweig
Zellkulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen 12,5 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (10ml)	Nunc, Wiesbaden

2.1.7 Software

Comet Assay II Messsystem Version 1.03	Perceptive Instruments, Haver-Hill Suffolk, UK
Ikaros Karyotyping System V 5.0	MetaSystems, Altlussheim
Metafer 4 Version 3.1.2	MetaSystems, Altlussheim
MS Windows XP	Microsoft, Redmont, USA
MS Excel 2003	Microsoft, Redmont, USA
MS Word 2003	Microsoft, Redmont, USA
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA
WinMDI Version 2.9	Joe Trotter

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Ampullen in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurde die Ampulle auf Eis transportiert und im Wasserbad bei 37 °C beinahe vollständig aufgetaut. Nachdem die Zellsuspension in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt wurde, tropfte man mittels einer dafür vorgesehenen Apparatur unter ständigem Schütteln 9 ml kaltes Medium (1 ml/min) zu der Zellsuspension dazu. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 rpm und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Durch Zugabe von 9 ml Medium und anschließender Zentrifugation wurden die Reste von DMSO aus der Zellsuspension gewaschen. Nach zweifacher Wiederholung des Waschschrittes wurde das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert und in eine T₂₅-Zellkulturflasche mit 5 ml Medium überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die adhärenenten Fibroblasten wurden meist in T₇₅-Zellkulturflaschen mit 10 ml Medium (DMEM + 10 % FCS) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig dreimal in der Woche gewechselt. Im Zuge des Mediumwechsels wurden die Zellen nach Abnahme des verbrauchten Mediums mit 5 ml Hanks gespült, um tote und abgeschwommene Zellen zu entfernen.

Das Subkultivieren, also Passagieren, der Zellen erfolgte in Abhängigkeit der Zelldichte und der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie. Dabei wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen wie beim Mediumwechsel durch Zugabe von 5 ml Hanks und leichtes Schwenken gespült. Da die Zellen adhärenent sind, wurden sie enzymatisch durch Zugabe von 4 ml einer warmen Trypsin/EDTA-Lösung und 3 min Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurde die Reaktion optisch kontrolliert und gegebenenfalls durch Klopfen verstärkt, um hartnäckig haftende Zellen zu lösen. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 6 ml

Medium gestoppt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Je nach Dichte der Kultur wurden die Zellen, meist im Verhältnis 1:2, in neue T₇₅-Zellkulturflaschen mit 10 ml vorgelegtem Medium ausgesät und weiter inkubiert. Da Fibroblasten allgemein sehr langsam und bei hoher Zelldichte besser wachsen, wurden diese relativ selten passagiert.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Beim Einfrieren von Zellen wurden diese wie unter 2.2.1.2 beschrieben abtrypsiniert, zentrifugiert und in 0,5 ml warmem Medium resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 0,6 ml eines frisch hergestellten DMSO Tieffriermediums (3,1 ml Medium + 0,5 ml DMSO) unter ständigem Schütteln hinzuge tropft (0,1 ml/min) und anschließend in eine zum Tieffrieren geeignete Ampulle überführt und sofort auf Eis gestellt. Nach 1,5 h in der Gasphase bei ca. - 80 °C wurde die Ampulle zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff (- 196 °C) überführt.

2.2.2 Comet Assay an Fibroblastenkulturen

2.2.2.1 Theoretische Grundlagen

Der Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, ist ein einfach und schnell durchführbarer Genotoxizitätstest auf Einzelzellniveau, welcher von Singh et al. (1988) entwickelt wurde. Mit der in dieser Arbeit verwendeten alkalischen Version (> pH 13) können DNA-Doppelstrangbrüche, DNA-Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen der DNA nachgewiesen werden. Das Prinzip des Comet Assays beruht darauf, dass Zellen auf einem mit Agarose beschichteten Objektträger lysiert und nach anschließender Alkalibehandlung elektrophoretisch aufgetrennt werden. In diesem elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol. Im Gegensatz zur intakten chromosomalen DNA, wandern vor allem kleine Stücke, also schadhafte chromosomale DNA-Fragmente aus dem Zellkern in Richtung Pluspol. Nach der Elektrophorese und Neutralisation der Präparate werden diese mit Ethidiumbromid gefärbt und können so unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Ihren Schaden hin untersucht werden. Die Intensität und Länge der gewanderten chromosomalen DNA-Fragmente, welche der Form eines Kometen ähneln, sind ein Anzeichen für den

Schaden jeder einzelnen Zelle. Je größer der Schweif des Kometen, desto größer der Schaden der Zelle, da demnach eine größere Anzahl an DNA-Bruchstücke aus dem Zellkern gewandert ist.

Um die DNA-Reparaturfähigkeit der einzelnen Zellen untersuchen zu können, wurden die kultivierten Fibroblasten durch eine Cs^{137} -Strahlungsquelle bestrahlt und anschließend unterschiedlich lang inkubiert, um den jeweils verbleibenden Schaden nach unterschiedlichen Reparaturzeiten mit einer unbehandelten Kontrolle vergleichen zu können.

2.2.2.2 Vorbereitung der Objektträger

Um eine gute Haftung der Agarose zu gewährleisten, wurden die Objektträger am Rand mit einem Diamantstift angeritzt. Anschließend wurde dieser bis knapp über den Mattrand in 60 °C warme Agarose (1,5 % MEO in PBS) getaucht. Die Rückseite wurde gründlich mit Zellstoff abgewischt und auf einer ebenen Fläche getrocknet. In getrocknetem Zustand waren die Objektträger mehrere Monate zur Aufbewahrung geeignet.

2.2.2.3 Vorbereitung der Zellen

Das Aussäen von 300.000 Zellen pro T_{12,5}-Zellkulturflasche erfolgte ein Tag vor der Versuchsdurchführung. Dabei wurden die in einer T₇₅-Zellkulturflasche kultivierten Fibroblasten wie bereits beschrieben abtrypsiniert, mit Hanks gespült und nach Zentrifugation in 2 ml Medium resuspendiert. Um die genaue Zellzahl pro μl Zellsuspension zu ermitteln, wurden 50 μl der Zellsuspension in ein Probengefäß mit 10 ml NaCl (0,9 %) pipettiert und mittels eines Zellzählers gezählt. Aus diesem Ergebnis ließ sich nun das notwendige Volumen errechnen, welches zum Aussäen von 300.000 Zellen benötigt wurde. Pro Zelllinie wurden drei voneinander unabhängige Tests durchgeführt. Hierfür wurden jeweils viermal 300.000 Zellen ausgesät, um unterschiedliche Reparaturzeiten miteinander vergleichen zu können. Darunter befand sich eine unbehandelte Kontrolle, sowie drei Proben mit 0, 15 und 30 min Reparaturzeit.

2.2.2.4 Herstellung der Präparate

Die Bestrahlung der Zellen wurde mit einer Cs^{137} -Strahlungsquelle und einer Strahlungsdosis von 3,8 Gy/min durchgeführt. Die Proben wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt, welche sich durch die geeignete Bestrahlungsdauer von 32 sec einstellen ließ. Die unbehandelte Kontrolle, sowie die Probe ohne Reparaturzeit wurden wie gewohnt abtrypsiniert und nach Zentrifugation in 100 μl Medium resuspendiert im Röhrchen bestrahlt. Die verbliebenen zwei Proben mit Reparaturzeiten von 15 und 30 min wurden in den Zellkulturflaschen bestrahlt, um für die anschließende Inkubation im Brutschrank gewohnte Bedingungen zu gewährleisten. Die Proben wurden auf Eis transportiert um eventuelle Reparaturreffekte zu minimieren.

Es wurden je 10 μl der jeweiligen Zellsuspension zusammen mit 120 μl LMP-Agarose (engl.: low melting point, 0,15 % in PBS), welche zuvor bei 80 °C geschmolzen und bei 37 °C warm gehalten wurde, aufgetragen und zur gleichmäßigen Verteilung mit einem Deckglas bedeckt. Zum Aushärten der Agarose wurden die Objektträger sofort auf einen Metallblock auf Eis gelegt, sodass nach einigen Minuten das Deckglas problemlos seitlich ohne Druck abgezogen werden konnte. Anschließend wurden die Objektträger für mindestens eine Stunde in einer 4 °C kalten Lyselösung in einer abgedunkelten Küvette im Kühlschrank aufbewahrt. In dieser Lyselösung wurden die Zellen lysiert, sodass Zytoplasmamembran und Kernmembran vollständig entfernt waren. Dieser Schritt ist entscheidend für die darauf folgende Elektrophorese und ermöglicht das Wandern der Nukleotide, da die DNA nach der Lyse frei in der Agarose vorliegt.

2.2.2.5 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nachdem sich die Präparate mindestens eine Stunde bei 4 °C in der Lyselösung befanden, wurden diese horizontal mit dem beschrifteten Mattrand nach oben in eine Elektrophoresekommer gelegt, welche in einer mit Eiswasser gefüllten Wanne stand. Die Präparate wurden mit ca. 1,5 l Elektrophoresepuffer (> pH 13) ausreichend bedeckt und für 25 min in alkalischem Milieu abgedunkelt denaturiert. Dabei wurde die doppelsträngige DNA denaturiert, wodurch Einzelstrangbrüche an alkalilabilen Stellen entstanden.

Auf die 25minütige Alkalidenaturierung folgte die eigentliche Elektrophorese von 25 min, indem eine Spannung von 25 Volt angelegt wurde und die Stromstärke durch Anpassung der Puffermenge auf 300 mA eingestellt wurde. In diesem Schritt wandern

die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Pluspol und bilden so je nach Schaden der Zelle die Form eines Kometen mit unterschiedlich großem Schweif.

2.2.2.6 Neutralisation der Präparate

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Präparate horizontal auf Färbebänke gelegt und neutralisiert. Dies geschah durch dreimaliges Überschichten mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris; pH 7,5) für jeweils fünf Minuten. Das darauf folgende Entwässern der Präparate erfolgte durch absoluten Ethanol in einer Küvette für wiederum fünf Minuten. Die luftgetrockneten Präparate konnten über mehrere Monate hinweg gelagert werden.

2.2.2.7 Färbung und Mikroskopie

Unmittelbar vor der Auswertung wurden die Präparate mit 50 µl einer Ethidiumbromid-Färbelösung (10 µg/ml) gefärbt und mit einem Deckglas vorsichtig eingedeckt. Um die Präparate vor Austrocknung zu schützen, wurden diese in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte bei 40-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter: 515-560 nm; Sperrfilter: 590 nm), welches über eine CCD-Kamera mit dem Computer verbunden war. Mit der Software „Comet Assay II Messsystem V 1.03“ konnte jede einzelne Zelle anhand ihrer DNA-Migrations-Eigenschaften charakterisiert werden. Die Software misst die DNA-Migration nach den Parametern Tail Migration (Abstand zwischen Kopf- und Schweifende des Kometen), Tail Length (Peak-Position des Kopfes und Schweifende), Tail Intensity (Prozentualer DNA-Anteil im Schweif) und das Tail Moment (Produkt aus Länge und Intensität).

In dieser Arbeit wurde lediglich das Tail Moment in die Bewertung miteinbezogen, da bei diesem Parameter sowohl der Effekt der Länge der Migration, als auch die Intensität der Migration berücksichtigt werden. Pro Präparat wurden 50 Zellen ausgezählt, wobei der Rand des Objektträgers ausgespart wurde, um eventuell mechanisch entstandene Schäden auszusparen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.3 Schwesterchromatidaustausch-Test an Lymphozytenkulturen

2.2.3.1 Theoretische Grundlagen

Unter Schwesterchromatidaustauschen (engl.: Sister Chromatid Exchange; SCEs) versteht man reziproke Austausche zwischen den einzelnen Schwesterchromatiden eines sich replizierenden Chromosoms.

Diese Schwesterchromatidaustausche entstehen nach entstandenen DNA-Doppelstrangbrüchen und den damit verbundenen Reparaturprozessen der DNA.

Da die ausgetauschten Chromosomenstücke der Schwesterchromatiden identische DNA-Sequenzen besitzen, ist dieser Vorgang für die Tochterzellen oder das weitere Bestehen der Zelle in der Regel nicht bedeutend, solange dieser auch an der exakt gleichen Stelle stattfindet. Aufgrund der identischen Schwesterchromatiden findet bei einem Schwesterchromatidaustausch kein Informationsaustausch statt.

Schwesterchromatidaustausche treten sowohl spontan, als auch durch mutagene Substanzen induziert auf und können dadurch als Maß für den Schaden einer Zelle herangezogen werden.

Zur Induktion der Schwesterchromatidaustausche wurde in der vorliegenden Arbeit Benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE) als Mutagen verwendet. BPDE zählt zu den polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und hat eine enorme kanzerogene Wirkung, indem es an die DNA bindet und dort DNA-Addukte, also kovalent verknüpfte Komplexe, ausbildet. Diese Verbindungen müssen bei der Replikation entfernt werden, was zur Entstehung der Schwesterchromatidaustausche führen kann.

Der Nachweis der Schwesterchromatidaustausche erfolgt durch differentielles Anfärben der beiden Chromatiden mit 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). BrdU ist ein Basenanalogen, welches anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird, indem es in die Zelle aufgenommen und anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat phosphoryliert. Bei UV-Bestrahlung verändert sich die Chromatinstruktur und somit die Färbereigenschaft der BrdU-markierten, UV-instabileren Schwesterchromatide, sodass diese nach Giemsa-Färbung heller erscheint. Somit können aufgrund der semikonservativen Replikation die beiden Chromatiden unterschieden werden und die Schwesterchromatidaustausche in der 2. Mitose, in der eine Chromatide unifilar und die andere Chromatide bifilar substituiert vorliegt, ausgezählt werden.

Die gemessene Rate der Schwesterchromatidaustausche der mit BPDE behandelten Zellen wurde mit einer parallel laufenden unbehandelten Kultur verglichen.

2.2.3.2 Ansetzen der Kultur

Das verwendete Medium wurde in 5 ml Aliquots bei - 20 °C gelagert.

Zu 100 ml RPMI-1640 (L-Glutamine, 25mM Hepes) wurden 20 ml FCS, 1,2 ml Phytohämagglutinin und 1,2 ml Gentamycin zugegeben. Die Zugabe des Phytohämagglutinins zum Medium spielte hierbei eine entscheidende Rolle, da dies das Wachstum der Kulturen stimulieren sollte.

Die Blutkulturröhrchen wurden beschriftet und auf 37 °C erwärmt. Pro Proband wurden vier Lymphozytenkulturen angesetzt, sodass für den spontanen und für den mutagen induzierten Ansatz je Doppelbestimmungen durchgeführt werden konnten. Zu den 5 ml an vorgelegtem Medium wurden je 500 µl peripheres Vollblut aus einer Lithium-Heparin Monovette zugegeben. Zu Beginn wurden nur die durch BPDE mutagenisierten Kulturen angesetzt, da diese in Anwesenheit von 2,5 µl 1 mM BPDE (Endkonzentration: 0,5 µM) für 30 min im Brutschrank inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden die mutagenisierten Kulturen 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert und währenddessen die spontanen Kulturen durch Zugabe von 500 µl peripherem Vollblut angesetzt.

Das Zentrifugat wurde nach Abnahme des Überstandes in ein frisches Röhrchen mit 5 ml Medium überführt. Um eine spätere Anfärbung der Chromosomenpräparate zu ermöglichen wurde den Kulturen 22 µl BrdU (5 mg/ml) zugesetzt, was einer Endkonzentration von 22 µg/ml entspricht. Anschließend wurden die Kulturen für 66-70 h bei 37 °C im Brutschrank horizontal inkubiert.

2-3 h vor Abbruch der Kulturen erfolgte die Zugabe von 50 µl Colcemid (10 µg/ml) mit einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml. Colcemid, ein synthetisches Analogon zu Colchizin ist ein Zellgift, welches den Spindelapparat der Zelle blockiert, was die Trennung der Schwesterchromatiden verhindert und so die Chromosomen in der Metaphase arretiert.

2.2.3.3 Abbruch der Kultur

Die 0,4 %ige KCl-Lösung wurde nach Herstellung autoklaviert und danach bei 4 °C aufbewahrt. Das Fixativ S (frisch zubereitet) aus drei Teilen Methanol und einem Teil Essigsäure, sowie das portionierte pure Methanol wurden bei - 20 °C aufbewahrt. Die Ibraimov-Lösung wurde ebenfalls immer frisch aus 92 ml a. bidest, 3 ml Methanol und 5 ml Essigsäure zubereitet und bei 4 °C gelagert.

Nach vierminütiger Zentrifugation der Kulturröhrchen bei 2.000 rpm wurde der Überstand auf ca. 500 µl abgenommen, das Pellet mit einer Plastik-Pasteurpipette resuspendiert und ins Pipetten-Reservoir aufgenommen. Es wurden 5 ml der KCl-Lösung (37 °C) ins Röhrchen gegeben, anschließend das Reservoir langsam ins Röhrchen entleert und vermischt. Um die Zellen in der hypotonen KCl-Lösung aufquellen zu lassen, wurden diese für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation mit anschließender Abnahme des Überstands bis auf 500µl, Resuspension und Zugabe von 5 ml der Ibraimov-Lösung, welche ohne Inkubation wieder abzentrifugiert wurde. Dieser Ablauf wurde im Folgenden mit 5 ml purem Methanol und zweimal mit Fixativ S durchgeführt, wobei die Zellen im zweiten Fixativ S im Kühlschrank bis zum Auftropfen der Chromosomenpräparate monatelang aufbewahrt werden konnten.

2.2.3.4 Herstellung der Präparate

Die Objektträger wurden zuvor mit einem in Alkohol getränkten Tuch entfettet und für mindestens eine Stunde in einer mit a. bidest gefüllten Küvette im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Nach vierminütiger Zentrifugation der Röhrchen bei 2.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit einer Glaspasteurpipette resuspendiert.

Von der Zellsuspension wurden ca. fünf Tropfen auf die horizontal liegenden feuchten und gekühlten Objektträger getropft. Das aus Methanol und Essigsäure bestehende Fixativ verdrängt das Wasser auf dem Objektträger, sodass die Metaphasen gespreitet werden.

Nach anschließender optischer Kontrolle auf Metaphasen ließ man die Präparate für 24 h im Brutschrank bei 37 °C trocknen bzw. altern.

2.2.3.5 Färbung und Eindeckung der Präparate

Die im Brutschrank getrockneten Präparate wurden in eine Färbewanne gelegt, mit 100 ml Sörensenpuffer bedeckt und für 30 min unter UV-Licht bestrahlt (Wellenlänge: 292 nm). Da BrdU UV-instabil ist, verändert diese Bestrahlung die Chromatinstruktur und daher die Färbereigenschaften der Chromatiden, welche vollständig nach BrdU-Zugabe synthetisiert wurden, sodass sich diese anschließend schlechter anfärben lassen und letztendlich heller erscheinen. Nach der Bestrahlung wurden die Objektträger in 2 x SSC (auf 60 °C vorgeheizt) für 60 min in einem 60 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Präparate kurz in a. bidest gewaschen und für 15 min in eine Küvette mit Giemsa-Färbelösung (8 % Giemsa in Sörensenpuffer) gestellt. Nach der Färbung wurden die Präparate dreimal in a. bidest gewaschen.

Nachdem die Präparate vollständig getrocknet waren, wurden diese mit Eukitt eingedeckt. Auf die zuvor in Xylol getauchten Präparate wurde mit Hilfe eines Glasstabes ein Tropfen Eukitt aufgetropft und diese anschließend mit einem Deckglas eingedeckt. Luftblasen wurden durch erneutes Eintauchen in Xylol entfernt.

2.2.3.6 Auswertung

Es wurden pro Proband jeweils 40 Metaphasen auf Schwesterchromatidaustausche hin untersucht. Dabei wurden 20 Metaphasen der mit BPDE induzierten Kultur mit 20 Metaphasen der spontanen Kultur verglichen.

Die Metaphasen wurden visuell an einem Durchlichtmikroskop ausgezählt, welches über eine Kamera mit einem Computer verbunden war. Die Auswertung der Metaphasen erfolgte mit der Software „Ikaros Karyotyping System V 5.0“.

2.2.4 Mitotic Delay-Test an Lymphozytenkulturen

2.2.4.1 Theoretische Grundlagen

Unter Mitotic Delay (engl.: Verzögerung der Mitose) versteht man eine mitotische Zellzyklusverschiebung, welche durch eine Anreicherung der Zellen entsteht, die sich zum Zeitpunkt der Messung in der G2-Phase befinden. Diese Verzögerung des Zellzyklus errechnet sich aus dem Verhältnis der G2- zur S-Phase einer schadensinduzierten Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

Die Verschiebung eignet sich sehr gut als Indikator für DNA-Reparaturvorgänge in einer Zelle. Werden DNA-Schäden vor Beginn der Mitose erkannt, stoppt die Zelle ihren Zyklus vor der eigentlichen Zellteilung am Übergang der G2- zur M-Phase, um den detektierten Schaden zu reparieren. Alle Zellen, die ihren Zellzyklus für Reparaturvorgänge stoppen, tragen so zur Anreicherung der G2-Phase bei. Die Zellen, die ihre DNA-Synthese in der S-Phase vollenden, treten ebenfalls in die G2-Phase über, sodass es zu der erwähnten Anreicherung der G2-Phase kommt. Je mehr Zellen sich nun zusätzlich in der G2-Phase befinden, desto größer ist die Verschiebung des Verhältnisses von der G2- zur S-Phase.

Um die Reparaturkapazität verschiedener Probanden untereinander zu vergleichen, wurden pro Proband zwei Blutkulturen angesetzt, von denen eine mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt wurde. Die Kulturen wurden durch Überführen in eine DAPI-Färbelösung abgebrochen und konnten so mit einem Flowcytometer ausgewertet werden.

Die Flowcytometrie bzw. Durchflusszytometrie ermöglicht ein Zählen und Differenzieren von Zellen. Voraussetzung dabei ist, dass die Zellen einzeln in der Suspension vorliegen, da sie sonst nicht detektiert werden können. Die Zellen passieren in einem engen Flüssigkeitsstrom eine Durchflussküvette und werden so an einem Lichtstrahl vorbeigeführt. Gemessen wird in 1.024 Kanälen, wobei jeder Kanal einer bestimmten Fluoreszenzintensität entspricht.

Die Zellen befinden sich in einer DAPI-Färbelösung, welche quantitativ an die DNA bindet. Demzufolge wird je nach DNA-Gehalt der Zelle eine andere Fluoreszenzintensität detektiert und dem entsprechenden Kanal zugeordnet. Je höher das Fluoreszenzsignal, desto höher ist der DNA-Gehalt der Zelle. Aus dem daraus resultierenden Histogramm kann nun aufgrund des zugeordneten Signals darauf geschlossen werden, wie viele Zellen sich in der jeweiligen Phase des Zellzyklus befinden und dadurch die mitotische Verzögerung berechnet werden.

2.2.4.2 Ansetzen der Kultur

Zum Ansetzen der Kulturen wurden die bereits aliquotierten Flachbodenröhrchen mit RPMI-Medium (siehe 2.2.3.2) verwendet, welche wiederum vor Gebrauch auf 37 °C aufgewärmt und ausreichend beschriftet wurden.

Nach Zugabe von je 500 µl peripherem Vollblut wurden die Kulturen für 50-54 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde bei einer der beiden Kulturen durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy ein Schaden induziert.

Nach Bestrahlung wurden die Kulturen für weitere 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4.3 Abbruch der Kultur

Um die Kulturen abubrechen, wurden in ein geeignetes Messröhrchen 1,5 ml einer DAPI-Färbelösung (Partec, DAPI staining solution) vorgelegt und dazu 400 µl der Lymphozytenkultur zugegeben. Die mit Parafilm verschlossenen Röhrchen wurden bis zur Messung am Flowcytometer bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4.4 Messung

Wie bereits in 2.2.4.1 beschrieben erfolgte die Messung der Proben an einem Durchflusszytometer der Firma Partec. Um eine klare Verteilung der Zellzyklusphasen zu erhalten, wurden die Einstellungen vor Beginn der Messung angepasst. Hierfür wurde das „Upper Level“ auf 999 und das „Lower Level“ auf 50 gesetzt, welche als so genannte Schwellenwerte angesehen werden können. Durch diese genauere Definition werden ankommende Signale über 50 bzw. über 999 ausgegrenzt, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten. Des Weiteren wurde der Strahlengang der Lichtquelle optimal justiert, um den Maximalwert der Peaks auf so wenige Kanäle wie möglich zu konzentrieren. Dies wurde anschließend durch eine passende Einstellung des „Gain Factor“, Verstärkungsfaktor des Strahlengangs, zusätzlich unterstützt.

Vor der Messung musste darauf geachtet werden, die Lampe des Durchflusszytometers warmlaufen zu lassen. Die im Kühlschrank gelagerten Röhrchen, sowie das sterile Wasser, welches zum Zählen benötigt wurde, wurden rechtzeitig auf Raumtemperatur gestellt.

Vor jedem Messvorgang wurde das System mit einer dafür vorgesehenen Spüllösung (Cleaning solution for Flow Systems) gewaschen.

Dadurch wurden eventuell verbliebene Zellen aus den Kapillaren gewaschen, welche sonst das Ergebnis der aktuellen Messung verfälscht hätten.

Die zu messenden Proben wurden für etwa 10 sec auf einem Vortexer gemischt, sodass sich wenn möglich nur vereinzelte Zellen in der Suspension befanden, um ein Verstopfen der feinen Kapillare zu verhindern.

Der Messvorgang wurde durch Einführen der Probe automatisch gestartet und nach 25.000 gezählten Zellen und einem Zählvolumen von 5 ml beendet. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde auf eine Rate von unter 100 Zellen pro Minute eingestellt.

Für die spätere Auswertung der Ergebnisse wurde das Histogramm ausgedruckt und die erhaltenen .FCS-Dateien auf Diskette gespeichert.

2.2.4.5 Auswertung

Um die gespeicherten .FCS-Dateien des Durchflusszytometers auswerten zu können, mussten diese mit der Software „WinMDI Version 2.9“ in Textdateien umgeschrieben werden. Diese wurden nachdem sie in „MS Word“ vertikal nach den Kanälen gereiht wurden zur weiteren Bearbeitung in eine Excel-Tabelle überführt. Durch die im Folgenden beschriebenen Schritte unter Berücksichtigung der einzelnen 1.024 Kanäle, fand eine Unterteilung der einzelnen Zellyklusphasen statt.

Zunächst wurde das Maximum der G1-Phase (G1 Max) bestimmt, welches durch den Kanal mit der maximalen Anzahl von Zellen dargestellt wird. Betrachtet man den gesamten Zellzyklus, so befinden sich die meisten Zellen in der G1-Phase, welche für die Ergänzung der Zellbestandteile und das Wachstum der Zelle verantwortlich ist. Um das Ende der G1-Phase (G1 Min) und dadurch den Beginn der S-Phase zu ermitteln, wurde in Richtung S-Phase jener Kanal bestimmt, dessen Wert gerade noch über der Hälfte der maximalen Zellzahl lag ($\frac{1}{2}$ G1 Max). Verdoppelte man nun die Anzahl der Kanäle weiter in Richtung S-Phase, war das Ende der G1-Phase definiert (G1 Min). Der nächste Kanal war demnach der Beginn der S-Phase. Die minimalen und maximalen Werte der G2-Phase wurden auf ähnliche Weise definiert. Dabei wurde wie bei der G1-Phase der Kanal des Maximalwertes (G2 Max) bestimmt und davon ausgehend in Richtung Ende der S-Phase jener Kanal ($\frac{1}{2}$ G2 Max) ermittelt, dessen Wert wiederum gerade noch über der Hälfte des Maximalwerts lag. Durch Verdopplung der Kanalanzahl in Richtung S-Phase war sowohl der Beginn der G2-Phase, als auch das Ende der S-Phase definiert.

Nachdem die einzelnen Zellzyklusphasen erfolgreich definiert waren, konnte die jeweilige Anzahl der Zellen ermittelt werden. Diese Information konnte dazu verwendet werden, um die in 2.2.4.1 beschriebenen mitotischen Verzögerungen und dadurch den Index des Mitotic Delay (MD Index) zu errechnen, welcher aus den Verhältnissen der G2- zur S-Phase zweier unterschiedlich behandelten Proben resultiert.

Dieser errechnet sich wie folgt:

$$\text{MD Index} = (\text{G2/S}_{\text{spontan}}) / (\text{G2/S}_{\text{induziert}})$$

2.2.5 Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen

2.2.5.1 Theoretische Grundlagen

Der Mikronukleus-Test (MNT) dient dem Nachweis nicht reparierter DNA-Doppelstrangbrüche, welche nach erfolgter Zellteilung erhalten bleiben. Bei der Zellteilung gehen aus DNA-Doppelstrangbrüchen entstandene Chromosomenfragmente in Form von Mikronuklei aus der Zelle hervor. Die von einer eigenen Kernmembran umhüllten Mikronuklei verbleiben im Zytoplasma und erscheinen als zusätzliche kleine Kerne, welche nach geeigneter Fixierung und Färbung am Fluoreszenzmikroskop auswertbar sind.

Wie auch in den vorangegangenen Versuchen wurde bei diesem Test jeweils, bzw. pro Patient eine spontane Probe mit einer induzierten Probe verglichen. Direkt im Anschluss an das Ansetzen der Kulturen, wurde bei einer der beiden Kulturen ein Schaden durch radioaktive Strahlung (Dosis 2 Gy) zugeführt. Um die auf diese Weise induzierten Chromosomenbrüche zu reparieren, wurden die Kulturen für 44 h im Brutschrank bei 37 °C horizontal inkubiert. Nachdem die Zellen 44 h Zeit hatten den gesetzten Schaden zu reparieren, erfolgte die Zugabe des Zytokinese-Blockers Cytochalasin B. Cyt B inhibiert die Polymerisation von Aktin, welches für die Bildung der Mikrofilamente benötigt wird. Diese wiederum sind für das Einschnüren des Zytoplasmas zwischen den Tochterzellen während der Zytokinese zuständig. Aufgrund veränderter Aggregation der Mikrofilamente kann die Kernteilung, jedoch nicht die Zellteilung vollzogen werden, sodass es zur Entstehung von binukleären Zellen kommt. Indem nur die binukleären Zellen zur Auswertung herangezogen werden, werden nur jene Zellen beachtet, die nach Zugabe von Cyt B genau eine Mitose durchlaufen haben.

Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Kulturen abgebrochen und auf Objektträger aufgetropft.

Die auf dem Objektträger fixierten Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) gefärbt. DAPI ist in der Lage spezifisch an DNA zu binden und eignet sich daher hervorragend zum Anfärben von Zellkernen.

Die Präparate wurden mit Hilfe eines automatisierten Systems an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, um am Ende die Mikronukleus-Rate (MN-Rate), also die Anzahl der Mikronuklei pro 1.000 binukleäre Zellen, errechnen zu können. Die MN-Rate ist demnach ein Indikator für den verbleibenden DNA-Schaden und gibt somit Auskunft über die Reparaturkapazität des jeweiligen Probanden.

2.2.5.2 Ansetzen der Kultur

Auch bei diesem Test wurden die mit RPMI-Medium vorportionierten Flachbodenröhrchen (siehe 2.2.3.2) verwendet, welche wiederum zuvor auf 37 °C aufgewärmt wurden.

Nach Zugabe von 500 µl peripherem Vollblut wurde eine der beiden Kulturen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Im Anschluss wurden die Kulturen für 44 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um den gesetzten Schaden reparieren zu können.

Um nach dieser Reparaturzeit die Zellteilung, jedoch nicht die Kernteilung, zu stoppen, wurden jeder Kultur 15 µl Cytochalasin B (2 mg/ml) zugegeben, was einer Endkonzentration von 6 µg/ml entspricht. Um eine Zellteilung in Anwesenheit von Cytochalasin B zu durchlaufen, wurden die Kulturen für weitere 24 h horizontal im Brutschrank inkubiert und anschließend abgebrochen.

2.2.5.3 Abbruch der Kultur

Vor dem Abbruch wurde eine hypotone KCl-Lösung (0,56 %) vorbereitet, autoklaviert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die beiden benötigten Fixative – Fixativ I bestehend aus fünf Teilen Methanol, einem Teil Essigsäure und sechs Teilen 0,9 % NaCl, sowie das Fixativ II bestehend aus fünf Teilen Methanol und einem Teil Essigsäure – wurden vor Gebrauch frisch hergestellt und auf - 20 °C gekühlt.

Die Blutkultur Röhrchen wurden für 4 min bei 2.000 rpm zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands bis auf etwa 500 µl mit einer Plastikpasteur-Pipette

resuspendiert, wobei die Suspension im Reservoir behalten wurde. Nach Zugabe von 5 ml der kalten hypotonen KCl-Lösung wurde die Suspension langsam ins Röhrchen entleert, vermischt und direkt im Anschluss zentrifugiert, da die Zellen nicht zu sehr quellen sollten. Um die Zellen zu fixieren erfolgte eine Behandlung mit den Fixativen I und II wie oben beschrieben. Nach der Zugabe des ersten Fixativs schloss sich eine 10minütige Inkubation an, bevor die Proben zentrifugiert wurden. Die Zugabe des Fixativs II erfolgte viermal, wobei auch hier nach der ersten Zugabe 10 min inkubiert und das vierte Fixativ im Röhrchen belassen wurde. Dadurch waren die Zellen bis zur Präparation haltbar und wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.5.4 Herstellung der Präparate

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der Objektträger, welche mit einem in Ethanol getränkten Tuch entfettet und in einer mit a. bidest gefüllten Küvette aufbewahrt wurden.

Nachdem die im Kühlschrank gelagerten Proben abzentrifugiert wurden, erfolgte die Abnahme des Überstands auf ca. 500 µl, je nach Sedimentgröße. Nach ausreichender Resuspension der Zellen wurden ca. 100 µl der Suspension mit einer Pipette in die Pipettenspitze aufgenommen. Der gewässerte Objektträger wurde mit einem Zellstoff auf der Rückseite und anschließend auf der Vorderseite abgewischt, wodurch ein leichter Wasserfilm auf der Vorderseite des Objektträgers verbleiben musste. Unmittelbar danach wurde die Suspension gleichmäßig aufgetropft und der Objektträger ausreichend beschriftet und zum Trocknen horizontal gelegt.

Die trockenen Objektträger wurden im Anschluss am Lichtmikroskop kontrolliert, dabei wurde besonders auf das Vorkommen binukleärer Zellen sowie die Dichte des Präparats geachtet. Waren die Zellen zu dicht bzw. dünn aufgetragen, wurde dies durch die Zugabe von Fixativ II bzw. dem Auftragen einer größeren Menge der Suspension ausgeglichen.

2.2.5.5 Färbung und Eindeckung der Präparate

Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gefärbt, welche spezifisch an die DNA bindet und unter UV-Licht blau fluoresziert. Die Färbelösung bestehend aus 15 µl DAPI (1 mg/ml) gelöst in 100 ml 4 x SSC, wurde in einer lichtgeschützten Küvette im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Färbung der getrockneten Präparate erfolgte für 10 min in der lichtgeschützten Küvette, welche im Anschluss daran zweimal in a. bidest gewaschen wurden. Bevor die Präparate eingedeckt werden konnten, wurden diese in einer lichtgeschützten Mappe getrocknet.

Eingedeckt wurden die Präparate mit etwa zwei Tropfen Vectashield®, einem speziellen Eindeckmedium für die Fluoreszenzmikroskopie, welches ein frühzeitiges Ausbleichen der Präparate verhindert.

2.2.5.6 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte automatisch an dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging, welches über eine Kamera mit einem Computer verbunden war.

Die Auszählung der binukleären Zellen und deren Mikrokerne wurde von der Software „Metafer 4 Version 3.1.2“ übernommen. Die Software ermöglichte ein Abspeichern mehrerer Classifier, die nach den verschiedensten Kriterien eingestellt werden können. Durch Einstellung unterschiedlicher Parameter konnten die binukleären Zellen und Mikrokerne definiert und somit für die Auszählung eingegrenzt werden. Nach Einstellung der optimalen Belichtungszeit fuhr dieses automatisierte Bildanalyse-System das komplette Präparat ab und markierte bzw. speicherte die Koordinaten, an denen binukleäre Zellen aufgetreten waren, welche den zuvor definierten Kriterien entsprachen. Als Ergebnis erhielt man eine Auflistung binukleärer Zellen mit der entsprechenden Anzahl an Mikrokernen. Wurden von dem System zwei oder mehr Mikrokerne erkannt, mussten diese im Anschluss visuell auf Ihre Richtigkeit überprüft werden. Dabei wurde zunächst überprüft, ob es sich überhaupt um eine binukleäre Zelle handelte und anschließend die Qualität des Mikrokerns beurteilt, welcher weder zu groß noch zu klein sein durfte und eine ebenmäßig kreisrunde Form aufweisen sollte. Des Weiteren musste die Färbung der Kerne beachtet werden, da manche Färbeartefakte als Mikronukleus gezählt wurden.

Jene binukleäre Zellen mit Mikronuklei, welche die Kriterien nicht erfüllten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

2.2.6 MNT mit BrdU-Nachweis an Fibroblastenkulturen

2.2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die Grundlagen dieses Versuches basieren im Wesentlichen auf dem Prinzip des in 2.2.5 beschriebenen Mikronukleus-Tests.

Aufgrund der zur Verfügung stehenden Fibroblastenkulturen einiger Probanden, entstand die Idee den Mikronukleus-Test als zusätzlichen Vergleichswert eines anderen Gewebes an diesen Kulturen durchzuführen.

Da diese Fibroblastenkulturen teilweise extrem langsam zu kultivieren waren und demnach die Ergebnisse verhältnismäßig schlecht ausfielen, wurde dieser Versuch auf Basis des gängigen Mikronukleus Tests modifiziert. Vor allem aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsverhältnisse der Kulturen war es wichtig, einen Proliferationsnachweis in den Versuch zu integrieren, sodass extrem langsam proliferierende Kulturen gegenüber besser wachsenden Zellen nicht einen vermeintlich geringeren DNA-Schaden aufweisen.

Der Versuch wurde mit Hilfe des „5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detektion Kit I“ von Roche durchgeführt, sodass es im Endeffekt möglich war ausschließlich bereits proliferierte Zellen in die Auswertung einzubinden. Wie schon in 2.2.3.1 erklärt, ist BrdU ein Basenanalogen, welches sich anstelle von Thymin in die DNA einbaut und so später nachgewiesen werden kann.

Der Versuchsablauf war bis auf die Antikörperbehandlung durch einen Anti-BrdU-Antikörper der Maus, sowie einen mit Fluorescein markierten Anti-Maus-Antikörper des Schafes sehr ähnlich.

Die Zellen wurden ausgesät und in Anwesenheit von 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) inkubiert, wobei eine der beiden Kulturen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt wurde. Die Zugabe des Zytokinese-Blockers Cytochalasin B, welcher die Zellteilung, jedoch nicht die Kernteilung blockiert, wurde aufgrund des Proliferationsnachweises ausgelassen. Da ausschließlich proliferierende Zellen sichtbar waren, konnte dieser Schritt vernachlässigt werden. Ein ausgezählter Mikrokern konnte offensichtlich nur aus einer sich in Anwesenheit von BrdU geteilten Zelle hervorgegangen sein.

Nach Abbruch der Kulturen wurden die aufgetropften Präparate einer Antikörperbehandlung unterzogen, wodurch proliferierende Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert waren. Im Anschluss daran wurden die

Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gegengefärbt.

Am Fluoreszenzmikroskop konnten die Präparate nun sowohl mit einem DAPI-, als auch einem FITC-Filter ausgewertet werden.

2.2.6.2 Ansetzen der Kultur

Die Fibroblastenkulturen wurden wie in 2.2.1.2 abtrypsiniert und ausgesät, wobei pro Zelllinie eine volle T₇₅-Zellkulturf Flasche auf zwei T₂₅-Zellkulturflaschen verteilt wurde. Nach etwa zwei Stunden, als sich die Zellen angeheftet hatten, wurde eine der beiden Kulturen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt.

Allen Kulturen, sowohl spontan als auch induziert, wurden 150 µl BrdU (500 µg/ml) zugegeben, was bei 5 ml Medium einer Endkonzentration von 15 µg/ml entspricht. Anschließend wurden die Kulturen in Abhängigkeit ihres Wachstums 72 h bzw. 96 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.6.3 Abbruch der Kultur

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen wie in 2.2.1.2 beschrieben abtrypsiniert und nach Abstoppen der Proteolyse in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Der folgende Ablauf entsprach dem des Mikronukleus-Tests an Lymphozytenkulturen (siehe 2.2.5.3) und wurde identisch durchgeführt. Nach Behandlung mit einer hypotonen KCl-Lösung (0,56 %) folgten die Fixierungsschritte mit den Fixativen I u. II.

2.2.6.4 Herstellung der Präparate

Auch die Herstellung der Präparate wurde in gleicher Weise wie beim Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen (siehe 2.2.5.4) durchgeführt, wobei aufgrund der geringen Zellzahl mehr Fixativ abgenommen werden musste, um eine geeignete Dichte der Präparate zu erhalten. Die getrockneten Präparate konnten nun der Antikörperbehandlung unterzogen werden.

2.2.6.5 *BrdU-Nachweis*

Der Nachweis der Zellen, welche BrdU eingebaut hatten, erfolgte wie bereits erwähnt mit Hilfe des „5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detektion Kit I“.

Die getrockneten Präparate mussten zunächst 3 x 10 min in einer Küvette mit 1 x PBS, welches auf 37 °C vorgewärmt war, auf dem Schüttler gewaschen werden.

Nachdem die Präparate in 1 x PBS gewaschen wurden, wurde pro Präparat ein Deckglas mit 100 µl der zuvor vorbereiteten Anti-BrdU-Gebrauchslösung (1:10 VD in Inkubationspuffer) versehen. Es wurde nun versucht das Präparat vorsichtig mit der Vorderseite auf das mit dem Antikörper versehene Deckglas zu legen. Es folgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C, währenddessen der Anti-BrdU-Antikörper der Maus an das eingebaute BrdU binden konnte.

Nach der Inkubation wurde das Deckglas abgeschüttelt, sodass die Präparate ein weiteres Mal 3 x 10 min in einer Küvette mit 37 °C warmen 1 x PBS auf dem Schüttler gewaschen werden konnten.

Es folgte die Behandlung mit dem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Ig-Fluorescein-Antikörper vom Schaf (1:10 VD in PBS). Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Anschließend wurden die Präparate ohne Deckglas erneut 3 x 10 min in einer Küvette mit 1 x PBS gewaschen und daraufhin getrocknet.

2.2.6.6 *Gegenfärbung der Präparate*

Um den Proliferationsindex der verschiedenen Zelllinien errechnen zu können, wurden die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) gegengefärbt. Jene Zellen, die während der Inkubation in Anwesenheit von BrdU proliferierten, wurden durch den Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert.

Hierfür wurde eine DAPI-Färbelösung mit 15 µl DAPI (1 mg/ml) gelöst in 100 ml 4 x SSC verwendet. Nach 10 min Färbung wurden die Präparate dreimal a. bidest gewaschen und zur weiteren Aufbewahrung in eine lichtgeschützte Mappe eingeordnet. Das Eindecken der Präparate erfolgte unmittelbar vor der Auswertung mit a. bidest.

2.2.6.7 Auswertung

Die Auswertung der Zellen und deren Mikrokerne erfolgte auch hier über das automatisierte Fluoreszenzmikroskop.

Bei diesem Versuch wurden die Präparate mit a. bidest eingedeckt, da die in den Vorversuchen mit Vectashield® eingedeckten Präparate störende fluoreszierende Signale lieferten, welche womöglich durch das Vectashield® selbst ausgelöst wurden.

Auch hier erfolgte die Auszählung der Präparate mit Hilfe der Software „Metafer 4 Version 3.1.2“. Zur Auszählung dieser mononukleären Zellen wurde ein anderer Classifier verwendet, welcher zuvor präzise auf das Auszählen einzelner Zellen und deren eventueller Mikrokerne eingestellt wurde.

Jedes Präparat wurde zweimal mit Hilfe der Software ausgezählt. Beim ersten Durchgang wurden unter Verwendung eines FITC-Filters die BrdU-markierten Zellen und deren Mikrokerne ausgezählt.

Um zusätzlich dazu noch die Proliferationsrate der Zelllinien ermitteln zu können, wurde auf einen DAPI-Filter umgestellt und somit alle sich auf dem Präparat befindenden Zellen ausgezählt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellen und Blutkulturen

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Fibroblasten aus Hautstanzen (Tumor- und Normalgewebe) verschieden stark betroffener Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1). Die Patienten wurden aufgrund der Anzahl ihrer Neurofibrome in zwei Gruppen eingeteilt. Es wurden dabei Patienten mit sehr vielen von Patienten mit wenigen Neurofibromen unterschieden. Die Unterschiede in der Anzahl an Neurofibromen lag dabei zwischen mehreren Hundert Neurofibromen in der einen Gruppe und ein paar wenigen Neurofibromen in der anderen Gruppe.

Für den Großteil der Versuche wurde heparinisiertes peripheres Vollblut von verschieden stark betroffenen Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 kultiviert und mit den beschriebenen Reparaturtests untersucht.

Die Probanden, die uns für diese Versuche Blutproben zur Verfügung stellten, konnten aufgrund der Hintergrundinformationen in zwei verschiedene Kollektive eingeteilt werden.

Kollektiv 1 (Brief + Sprechstunde)

Bei diesem Kollektiv handelt es sich um Patienten, die bereits bekannt und von denen auch Fibroblastenkulturen vorhanden waren. Die Blutproben jener Patienten, die mit der Teilnahme einverstanden waren, wurden uns per Post zugesandt.

Bei vier dieser Personen handelte es sich um Patienten, die im Zuge eines Beratungsgesprächs in einer NF1 Sprechstunde auf diese Arbeit aufmerksam wurden und einer Teilnahme zugestimmt hatten.

Kollektiv 2 (Bonn)

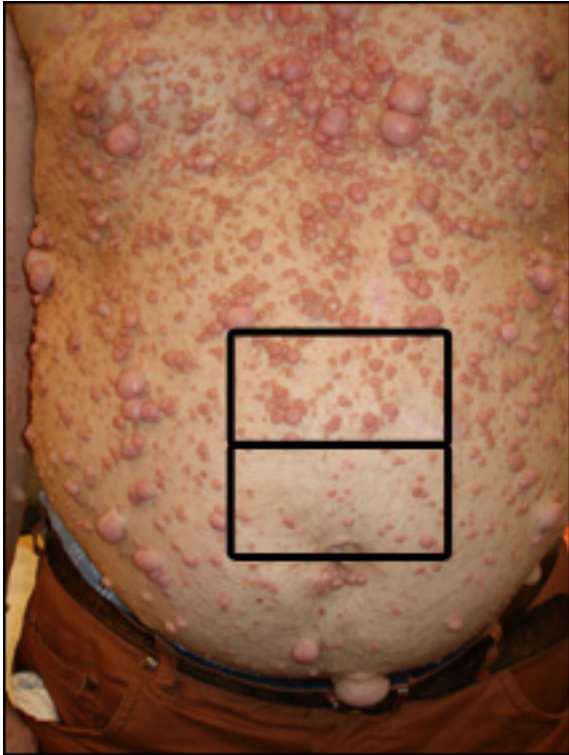
Bei diesem Kollektiv handelt es sich um 24 Personen, die sich auf einer Neurofibromatose Selbsthilfe-Tagung in Form einer Blutspende und anschließendem Beratungsgespräch zu einer Teilnahme entschlossen hatten.

Wie bereits erwähnt, unterschieden sich die zur Verfügung stehenden Hintergrundinformationen der beiden Kollektive, welche der folgenden Tabelle 3.1 zu entnehmen sind.

Kollektiv 1 wurde aufgrund der ungefähren Anzahl an Neurofibromen lediglich in zwei Gruppen – Patienten mit vielen (mehreren Hundert) bzw. Patienten mit ein paar wenigen Neurofibromen – unterteilt. Des Weiteren konnte bei diesem Kollektiv das Alter und das Geschlecht der Patienten berücksichtigt werden.

Bei Kollektiv 2 stand uns ausreichend Bildmaterial (Aufnahmen von dorsal und ventral) zur Verfügung, sodass eine durchaus genauere Charakterisierung der Patienten möglich war. Hierzu wurden drei Areale definiert und die Anzahl der darin enthaltenen Neurofibrome bestimmt. Aufgrund der gesamten Anzahl an Neurofibromen der drei Areale konnte der Zusammenhang zwischen der individuellen Anzahl an Neurofibromen und der aus den Tests erhaltenen Reparaturkapazitäten überprüft werden. Zusätzlich fand auch bei diesen Patienten eine Einteilung in die zwei oben erwähnten Gruppen statt.

- Areal 1:
Das Areal wurde vom Bauchnabel ausgehend in Abhängigkeit dessen Größe definiert. Die vier Eckpunkte des Feldes (drei Einheiten nach links und rechts, sowie drei Einheiten nach oben) bildeten ein tatsächliches Areal von 18 cm². Bei einer Bauchnabelgröße von 1 cm entsprach die Einheit 1 cm.
- Areal 2:
Dieses Areal liegt dem Areal 1 auf, indem es um jeweils drei Einheiten nach oben erweitert wurde und kann daher als Verlängerung von Areal 1 angesehen werden.
- Areal 3:
Ausgangspunkt dieses Areals waren die Koordinaten der Hüftknochen und der Wirbelsäule. Ausgehend von diesem Koordinatenkreuz ergaben sich die Eckpunkte des Areals (fünf Einheiten nach links und rechts, sowie jeweils fünf Einheiten nach oben), sodass ein Areal von 50 cm² ausgezählt werden konnte.



A



B

Abbildung 3.1: Areale zur Auszählung der Neurofibrome.

Dargestellt sind die drei Areale an Bauch (Bild A) und Rücken (Bild B), welche zur Auszählung der in Tabelle 3.1 aufgeführten Anzahl an Neurofibromen herangezogen wurden.

Tabelle 3.1: Auflistung aller untersuchten Probanden der beiden Kollektive, von denen Lymphozytenkulturen zur Verfügung standen.
 Inklusive folgender Hintergrundinformationen: Einteilung in zwei Gruppen je nach Ausprägung der Krankheit, Anzahl an Neurofibromen der drei ausgezählten Areale, Geschlecht und Alter.

Kollektiv	Pat. Nr.:	viel (1) wenig (0)	Areal 1	Areal 2	Areal 3	Σ	männl. (1) weibl. (0)	Alter
1	NF 17	1					0	69
1	NF 117	1					0	74
1	NF 222	1					0	67
1	NF 142	1					1	61
1	NF 58a	1					1	59
1	NF 84a	0					0	65
1	NF 108	0					1	61
1	NF 196	0					0	46
1	NF 163d	0					1	45
1	NF 227	0					0	63
1	NF 300_1	0					0	64
1	NF 300_2	0					0	35
1	NF 300_3	0					0	28
1	NF 301	0					0	22
2	NF B_1	0	1	1	2	4	1	41
2	NF B_2	1	14	28	35	77	0	52
2	NF B_3	0	1	0	0	1	1	16
2	NF B_4	1	31	73	80	184	1	42
2	NF B_5	1	5	24	5	34	1	47
2	NF B_6	1	30	50	61	141	0	52
2	NF B_7	0	1	0	2	3	1	47
2	NF B_8	0	5	2	4	11	1	46
2	NF B_9	0	7	14	18	39	0	37
2	NF B_10	0	7	14	24	45	1	43
2	NF B_11	1	5	13	37	55	1	48
2	NF B_12	0	0	2	0	2	0	49
2	NF B_13	1	9	20	36	65	1	55
2	NF B_14	0	6	5	6	17	0	51
2	NF B_15	1	35	48	39	122	0	36
2	NF B_16	1	14	27	65	106	0	55
2	NF B_17	0	1	0	4	5	1	41
2	NF B_18	0	0	0	0	0	0	37
2	NF B_19	1	31	33	24	88	0	49
2	NF B_20	0	0	0	0	0	1	69
2	NF B_21	1	37	55	38	130	0	52
2	NF B_22	0	0	0	1	1	0	44
2	NF B_23	1	46	41	66	153	1	59
2	NF B_24	0	0	1	0	1	1	31

3.2 Comet Assay

3.2.1 Etablierung

Die Durchführung des Comet Assays fand an Fibroblastenkulturen zwölf verschiedener Probanden statt, von denen jeweils sechs Probanden eine hohe bzw. geringe Anzahl an Neurofibromen aufwiesen und somit miteinander verglichen werden konnten.

Der Comet Assay ist relativ schnell und einfach durchführbar und hat in Anbetracht der geringen Teilungsrate der verwendeten Fibroblastenkulturen den wesentlichen Vorteil, dass dieser Test proliferationsunabhängig ist. Dadurch konnten auch sehr langsam proliferierende Kulturen in den Versuch miteinbezogen werden, ohne das Ergebnis aufgrund unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten zu verfälschen.

Die Fibroblasten wurden mit einer Dichte von jeweils 300.000 Zellen in vier 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Schadensinduktion mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Diese Dosis erwies sich in den Vorversuchen als angemessen und wurde weiterhin übernommen.

Um die Reparaturkapazitäten der einzelnen Probanden untersuchen zu können, wurden die Kulturen nach Bestrahlung unterschiedlich lange zur Reparatur inkubiert und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Es wurden Reparaturzeiten von 0, 15 und 30 min miteinander verglichen, wobei die unbehandelte Kontrolle sowie die Probe ohne Reparaturzeit direkt im Anschluss an die Bestrahlung aufgetragen wurde.

Nachdem die Zellen der verschiedenen Proben auf die mit Agarose beschichteten Objektträger aufgetragen waren, wurden die Präparate für eine Stunde bei 4 °C in einer Lyselösung lysiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate mittels Elektrophorese einem elektrischen Feld ausgesetzt, wobei DNA-Bruchstücke den Zellkern in Richtung Pluspol verlassen. Die Intensität der gewanderten DNA-Fragmente ist ein Maß für den Schaden einer Zelle und kann nach geeigneter Färbung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchs kann in Kapitel 2.2.2 nachgelesen werden.

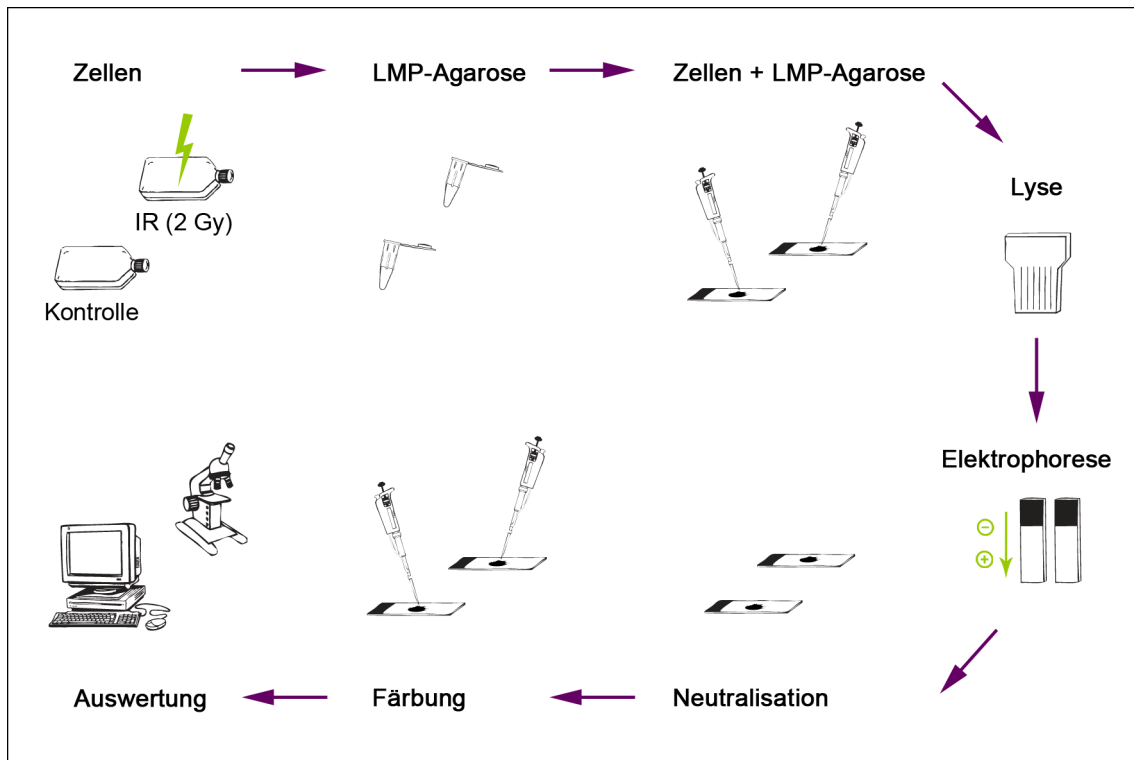


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf des Comet Assay Tests an Fibroblastenkulturen

Bereits nach den ersten Versuchen ließ sich eine klare Abnahme des verbleibenden DNA-Schadens der Zellen mit der Zeit erkennen. Bereits nach 30 min wiesen die Zellen beinahe den gleich geringen Schaden wie die Kontrollen auf. Nach Versuchen mit anderen, kürzeren Reparaturzeiten erwiesen sich die Reparaturzeiten von 0, 15 und 30 min dennoch am sinnvollsten und wurden deshalb für die gesamte Versuchsreihe angewendet.

3.2.2 Vergleich zweier Patientengruppen

Wie bereits erwähnt wurden bei diesem Test Fibroblastenkulturen zwölf verschiedener Neurofibromatose Typ 1 Patienten auf Ihre Reparaturkapazität hin untersucht, welche sich aufgrund der Anzahl an Neurofibromen bzw. der Schwere der Erkrankung in zwei Gruppen zu jeweils sechs Patienten einteilen ließen.

Generell wurden von jeder Zelllinie drei voneinander unabhängige Tests mit Doppelbestimmung durchgeführt.

Gemessen wurde der nach Bestrahlung verbleibende DNA-Schaden von jeweils 50 einzelnen Zellen nach 0, 15 und 30 min Reparaturzeit, sowie einer unbehandelten Kontrolle.

Der verbleibende DNA-Schaden der einzelnen Zellen wurde nach Färbung mit Ethidiumbromid am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

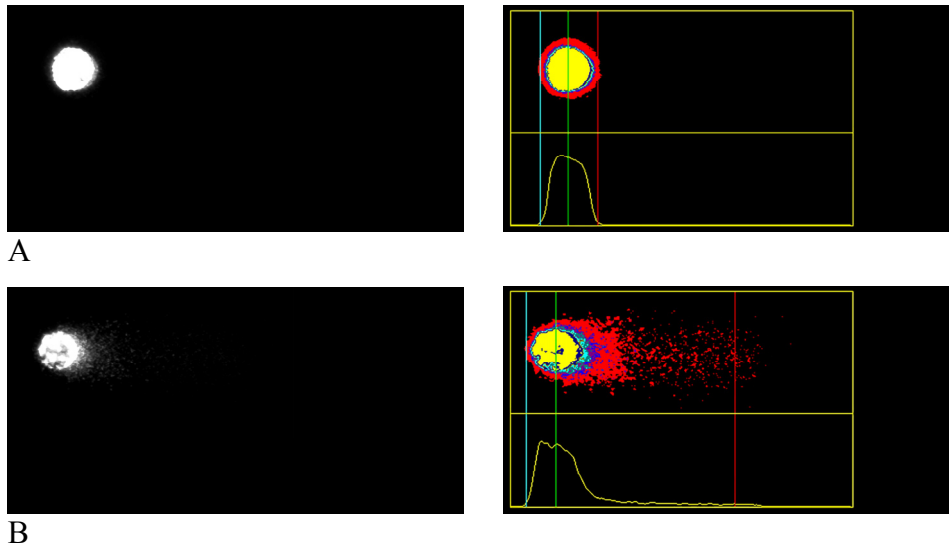


Abbildung: 3.3: Aufnahmen einer unbehandelten und bestrahlten Zelle des Comet Assay Tests.

Dargestellt sind die Bilder zweier unterschiedlich behandelter Zellen, welche an einem Fluoreszenzmikroskop und einem geeigneten Bildanalysesystem ausgewertet wurden.

A: Dargestellt ist eine unbehandelte Zelle, die kaum einen Schaden aufweist.

B: Dargestellt ist eine bestrahlte Zelle (Dosis 2 Gy), welche direkt im Anschluss an die Bestrahlung aufgetragen wurde und im Vergleich zu der Kontrolle einen sehr hohen Schaden aufweist.

Das in den folgenden Abbildungen gezeigte Tail Moment (Produkt aus Länge und Intensität) ist in dieser Arbeit der einzig verwendete Parameter, da dieser sowohl den Effekt der Länge, als auch die Intensität der Migration berücksichtigt und somit den verbleibenden DNA-Schaden jeder einzelnen Zelle am Besten widerspiegelt.

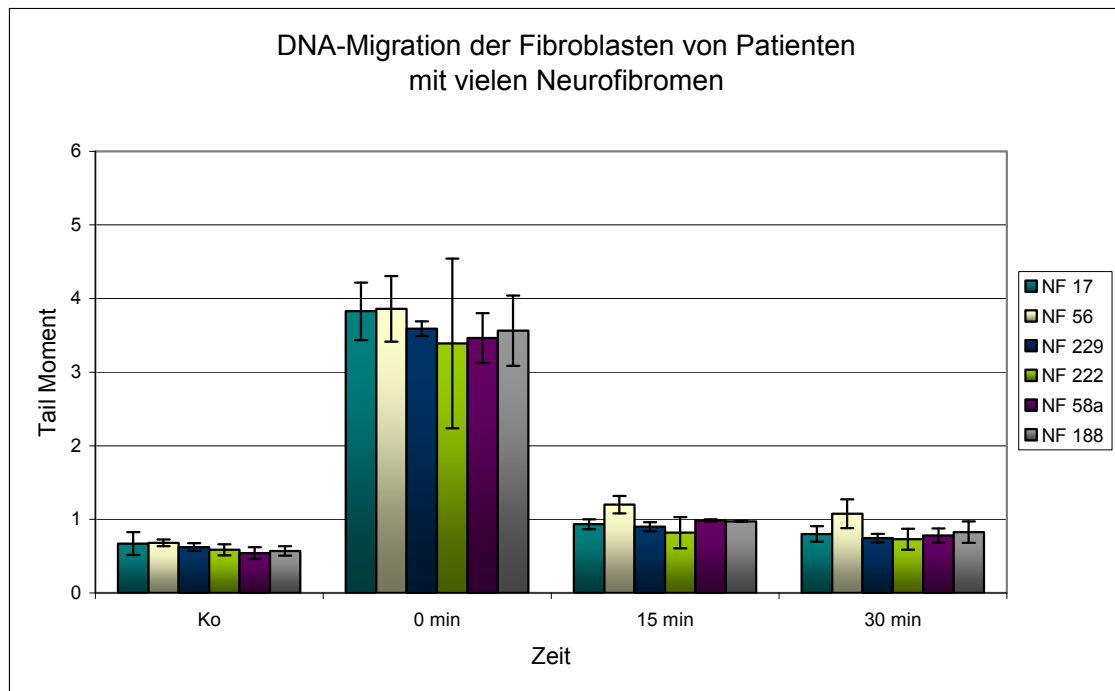


Abbildung 3.4: Abnahme der DNA-Migration von Fibroblastenlinien nach verschiedenen Reparaturzeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte der DNA-Migration aus drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung (Comet Assay > pH 13).

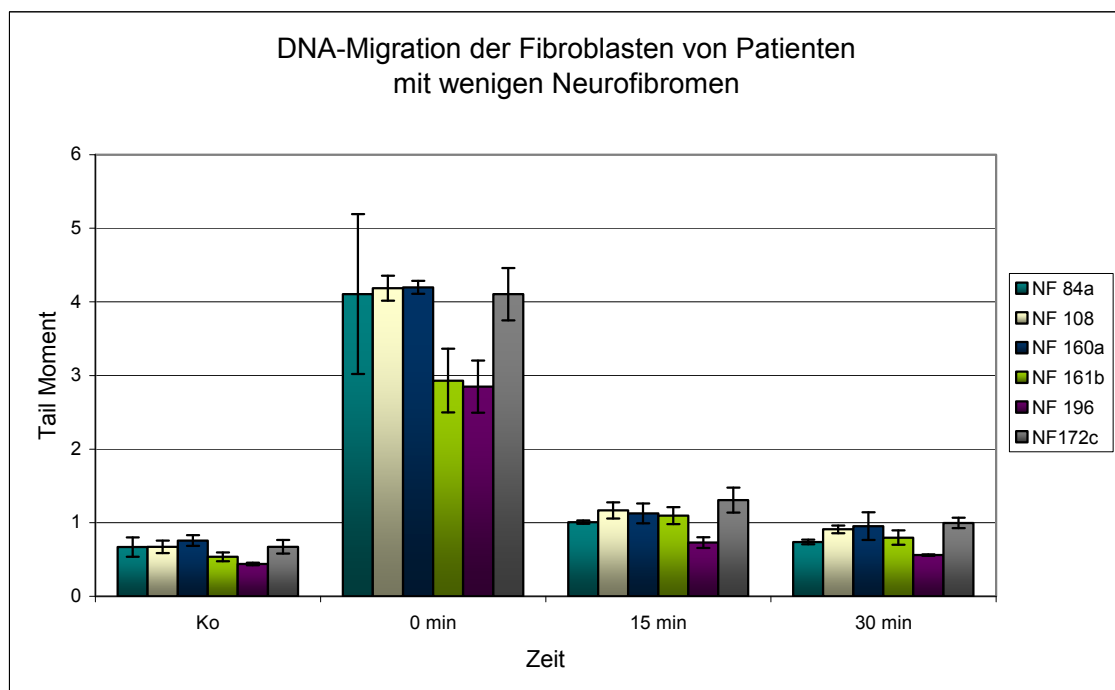


Abbildung 3.5: Abnahme der DNA-Migration von Fibroblastenlinien nach verschiedenen Reparaturzeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte der DNA-Migration aus drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung (Comet Assay > pH 13).

Die in den Abbildungen dargestellten Mittelwerte der drei unabhängig voneinander durchgeführten Tests variieren innerhalb der jeweiligen beiden Gruppen verhältnismäßig stark.

Wie man aus den Standardabweichungen erkennen kann, unterscheiden sich auch die einzelnen Werte der drei Versuche. Auffallend ist dies vor allem bei jenen Proben zu erkennen, die unmittelbar nach Bestrahlung, also ohne Reparaturzeit aufgetragen wurden.

Die einzelnen Werte der unbehandelten Proben, die als Kontrollen mitgeführt wurden blieben mit Werten von 0,44 bis 0,76 in beiden Gruppen recht konstant, sodass eine gleichmäßige Durchführung des Versuchs bestätigt wurde.

Diese Abbildungen deuten bereits auf einen verhältnismäßig gleich verbleibenden Schaden und somit auf eine ähnliche Reparaturkapazität der beiden Patientengruppen hin.

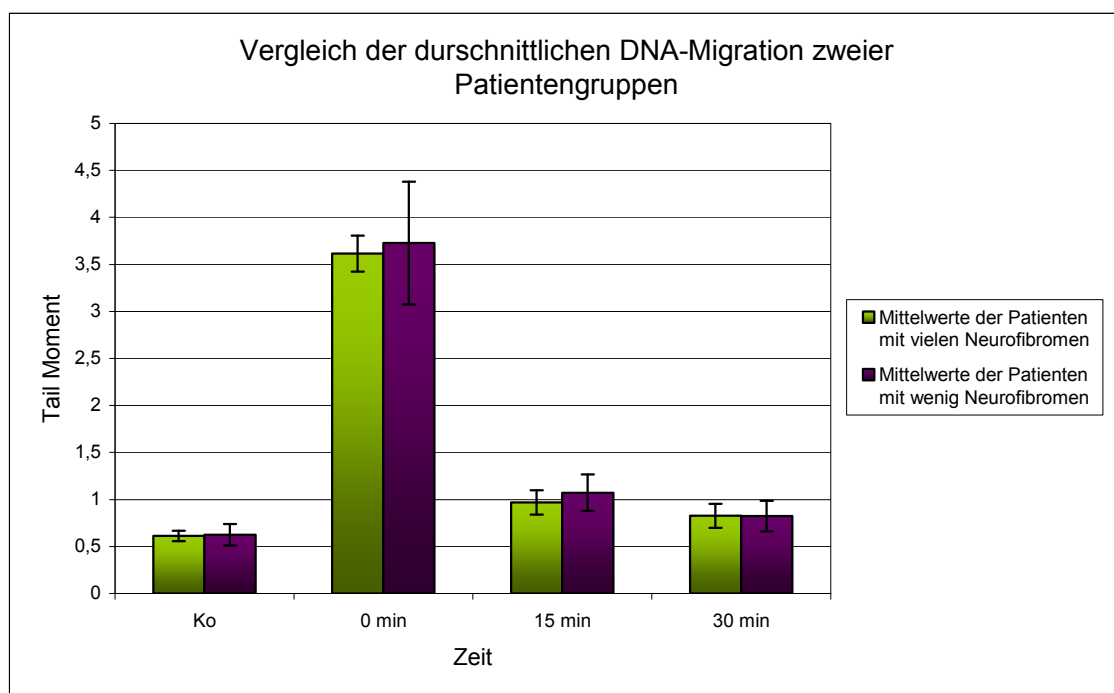


Abbildung 3.6: Durchschnittliche Abnahme DNA-Migration zweier Patientengruppen im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte der DNA-Migration aus drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmung von jeweils sechs Patienten pro Gruppe (Comet Assay > pH 13).

Wie sich bereits in den Abbildungen der beiden Patientengruppen vermuten ließ, deuten die Ergebnisse auf keine unterschiedliche Reparaturkapazität der Patienten hin.

In Abb. 3.6 sind die Mittelwerte der unterschiedlichen Reparaturzeiten, sowie der Kontrolle beider Patientengruppen dargestellt.

Wie man auf den ersten Blick erkennen kann, gibt es zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in Bezug auf die DNA-Reparaturkapazität.

Wesentliche Unterschiede sind bei keinem der vier Zeitpunkte zu erkennen. Die Mittelwerte der beiden Gruppen sind sich sehr ähnlich und auch die Standardabweichungen sind bis auf die Werte von den Patienten mit wenig Neurofibromen nach 0 min Reparaturzeit sehr gering. Nach 30 min Reparaturzeit im Anschluss an die Bestrahlung ist der verbleibende Schaden im Mittelwert mit einem Tail Moment von 0,83 bei beiden Gruppen exakt gleich groß.

Dieser geringe Wert des verbleibenden DNA-Schadens ist annähernd identisch mit dem der unbehandelten Kontrolle, sodass in Zellen beider Gruppen nur ein Bruchteil der DNA-Doppelstrangbrüche unrepariert blieb.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit diesem Test keine Unterschiede der Reparaturkapazität der beiden unterschiedlich stark betroffenen Gruppen nachgewiesen werden konnten. Somit kann durch die Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität der Zellen durch den Comet Assay kein Rückschluss auf die Anzahl der Neurofibrome der betroffenen Patienten gezogen werden.

3.3 Schwesterchromatidaustausch-Test

3.3.1 Etablierung des SCE-Tests an Fibroblastenkulturen

Da sich zu Beginn der Arbeit die Fragestellung auf die bereits vorhandenen Fibroblastenkulturen bezog, wurde auch eine Etablierung dieses Tests an Fibroblasten versucht. Dies gestaltete sich aufgrund der sich langsam teilenden Zellen als sehr schwierig. Im Laufe dieser Vorversuche wurde versucht, den optimalen Zeitraum zwischen Kulturansatz und Abbruch der Kultur, sowie die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien zu etablieren.

Aufgrund der langsamen Teilungsrate der verwendeten Fibroblasten war es nicht möglich, Präparate mit geeigneten Metaphasen zu erhalten, da es beinahe unmöglich

war gerade jene Zellen in ausreichender Menge auf das Präparat zu bekommen, die sich in der zweiten Metaphase nach BrdU-Zugabe befanden und somit zwei S-Phasen durchlaufen hatten.

Die Durchführung des Versuches an diesen Zelllinien war nicht möglich, sodass auch hier auf Lymphozytenkulturen zurückgegriffen werden musste.

3.3.2 SCE-Test an Lymphozytenkulturen

Der Schwesterchromatidaustausch-Test an Lymphozytenkulturen wurde bereits im Vorfeld ausreichend etabliert und an die Verhältnisse der Zellen angepasst. Das Prinzip des SCE-Tests beruht auf der Entstehung von SCEs, also reziproken Austauschen zwischen den Schwesterchromatiden, welche als Indikator für DNA-Schäden angesehen werden können. Durch Zugabe von BrdU ist es möglich, die Schwesterchromatiden voneinander zu unterscheiden, sodass die SCEs nach geeigneter Färbung ausgezählt werden können. Durch Behandlung mit dem Mutagen BPDE konnten die SCEs der verschiedenen Patienten verglichen werden, wobei aufgrund einer hohen Anzahl an SCEs auf eine geringe DNA-Reparaturkapazität geschlossen werden konnte.

Der hierbei angewendete Versuchsablauf ist in Kapitel 2.2.3 ausführlich beschrieben. Der schematische Ablauf des Versuchs ist in folgender Abbildung dargestellt.

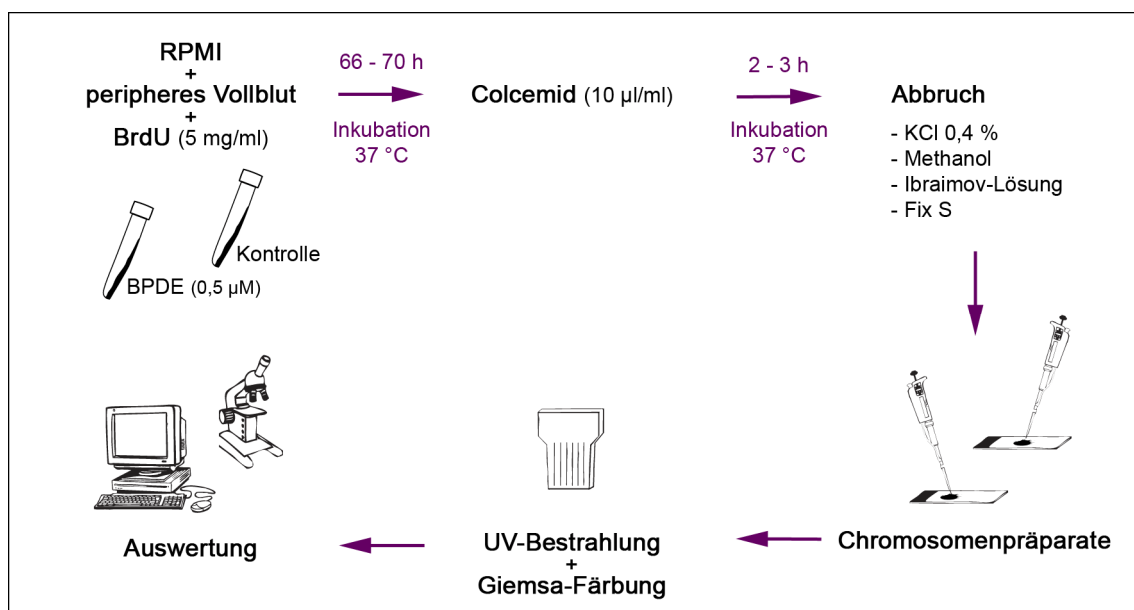


Abbildung 3.7: Schematischer Ablauf des SCE-Tests an Lymphozytenkulturen

Nach Abbruch der Kulturen und Herstellung der Präparate konnten diese, nachdem Sie in Giemsa gefärbt wurden, eingedeckt und ausgewertet werden. Bei der Auswertung am Lichtmikroskop wurden die Metaphasen durch eine mit dem Computer verbundene Kamera aufgenommen. Dadurch konnten die einzelnen Metaphasen mit einer geeigneten Software bearbeitet, ausgezählt und als Bild abgespeichert werden. Bei der Auswertung konnten nun die Schwesterchromatidaustausche (SCEs) eines jeden einzelnen Chromosoms gezählt werden, wobei pro Proband 40 Metaphasen – jeweils 20 davon induziert und 20 spontan – ausgezählt wurden.

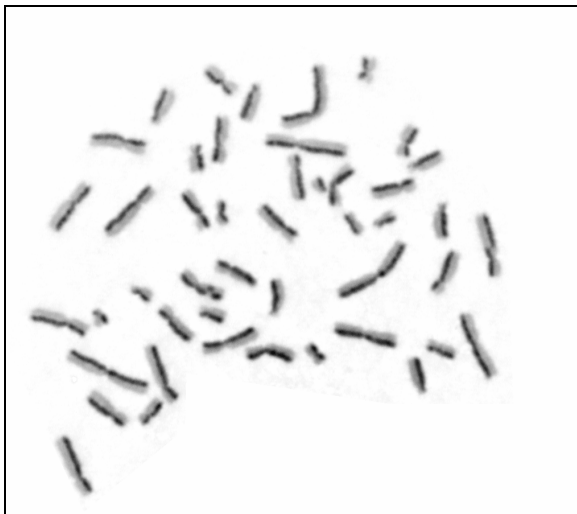


Abbildung 3.8: Metaphasen mit SCEs spontaner und durch BPDE induzierter Zellen. Dargestellt sind Metaphasen von Zellen, die in Abwesenheit von BrdU zwei Zellzyklen durchlaufen haben, wodurch eine Chromatide unifilar und die andere Chromatide bifilar substituiert vorliegt. Nach Fluoreszenz Plus Giemsa-Färbung werden BrdU substituierte Chromatiden schwächer angefärbt, sodass die SCEs ausgezählt werden können.

In folgender Abbildung ist die durchschnittliche Anzahl an SCEs der Patienten aus Kollektiv 1 dargestellt.

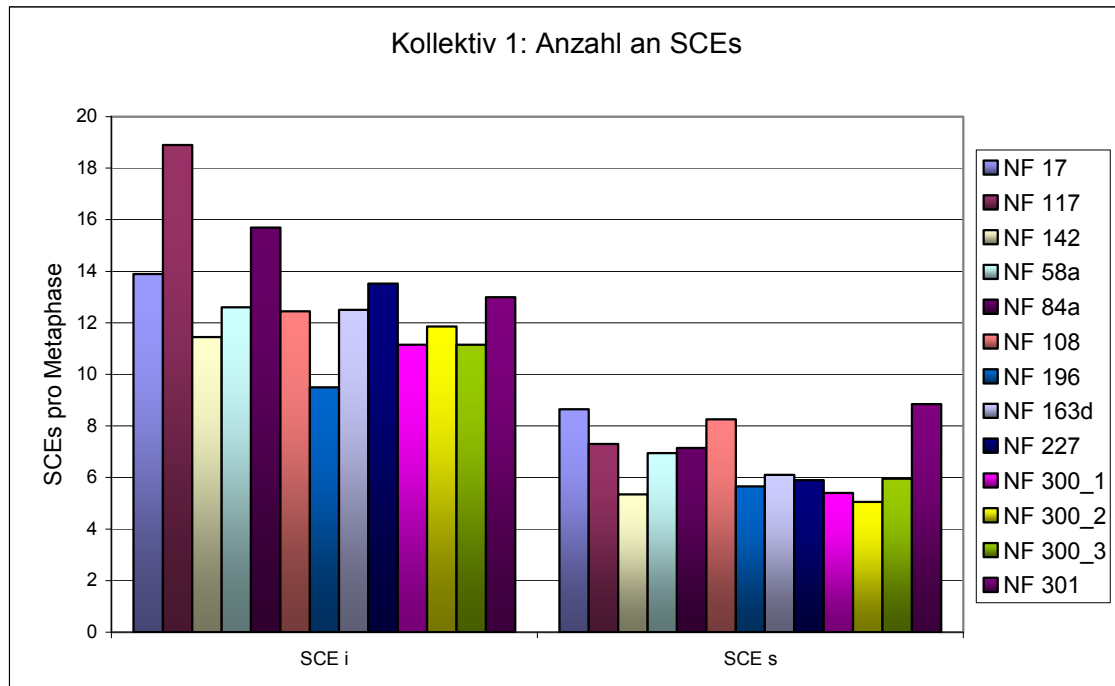


Abbildung 3.9: Anzahl an SCEs der spontanen und BPDE induzierten Lymphozytenkulturen von Kollektiv 1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 20 ausgezählten Metaphasen pro Patient und Kultur.

Stellt man wie in Abbildung 3.9 die Ergebnisse in einem Diagramm dar, so ist hier ein klarer Unterschied zwischen den induzierten und spontanen Kulturen zu erkennen. Die Metaphasen der unbehandelten Kulturen weisen deutlich weniger SCEs auf. Die hier dargestellten Werte entsprechen der durchschnittlichen Anzahl an SCEs von 20 ausgezählten Metaphasen. Die Anzahl an SCEs der spontanen Kulturen liegt deutlich unter 10 und erreicht einen Mittelwert von 6,66 SCEs pro Metaphase. Im Gegensatz dazu stehen die Werte der durch BPDE induzierten Kulturen mit einem deutlich höheren Mittelwert von 12,90 SCEs pro Metaphase. Dies entspricht beinahe der doppelten Anzahl an SCEs, die aufgrund des gezielt zugeführten Schadens im Durchschnitt entstanden sind. Die Auswirkungen dieses Schadens bzw. der verbleibende Schaden durch diese Behandlung wirkt sich nicht bei allen Probanden gleich aus, sodass dieser bei den verschiedenen Personen Werte von 9,50 bis 18,90 SCEs pro Metaphase anzeigt. Bei den spontanen Kulturen sind diese Schwankungen nicht so enorm und reichen von 5,05 bis 8,05 SCEs pro Metaphase.

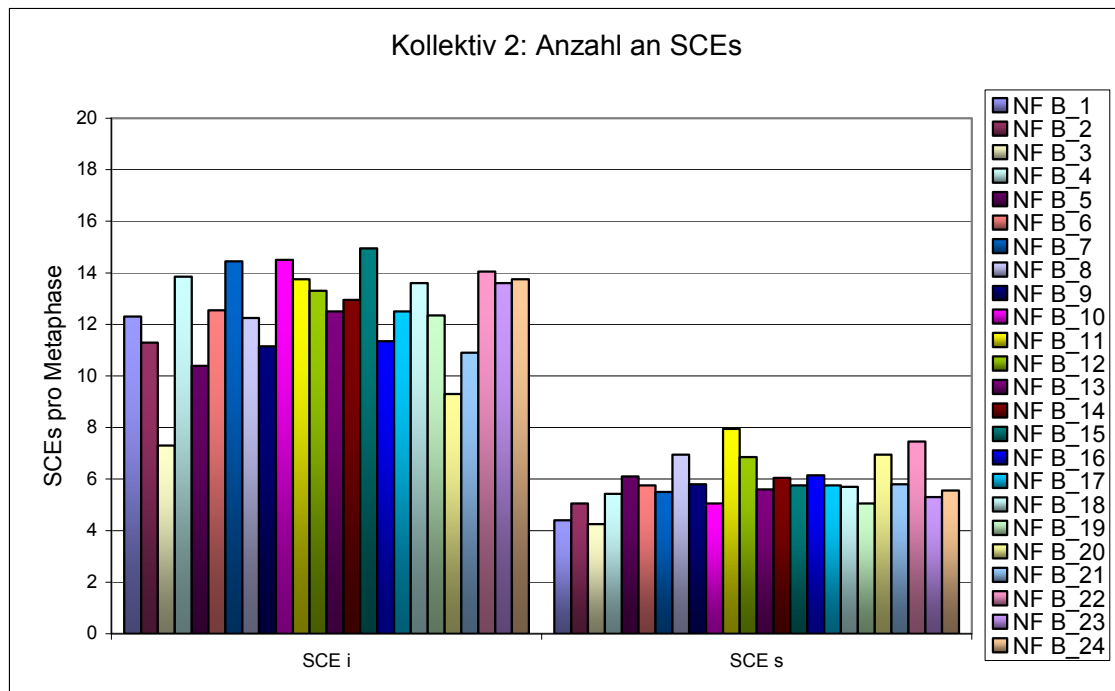


Abbildung 3.10: Anzahl an SCEs der spontanen und BPDE induzierten Lymphozytenkulturen von Kollektiv2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je 20 ausgezählten Metaphasen pro Patient und Kultur.

Die in Abbildung 3.10 gezeigten Werte von Kollektiv 2 weisen ein ähnlich verteiltes Muster auf. Auch hier ist die durchschnittliche Anzahl an SCEs 20 ausgezählter Metaphasen aufgetragen. Auf den ersten Blick scheint bei diesem Kollektiv jedoch die Anzahl an SCEs tendenziell etwas niedriger auszufallen. Die Werte der spontanen Proben reichen von 4,25 bis 7,95 SCEs pro Metaphase und erreichen ähnlich dem des Kollektivs 1 einen Mittelwert von 5,84 SCEs pro Metaphase. Bei den mit BPDE behandelten Kulturen sind die Werte auch hier wesentlich höher als die der Kontrollen und reichen bei einem Mittelwert von 12,45 SCEs pro Metaphase von 7,30 bis 14,95 SCEs pro Metaphase.

Auffallend niedrig im Vergleich zu den Anderen sind in diesem Diagramm vor allem die Werte des Probanden B_3, welcher sowohl bei der induzierten, als auch der spontanen Kultur die geringste Anzahl an SCEs aufweist. Demnach kann man bei dieser Kultur selbst nach Schadensinduzierung durch BPDE eine geringere Anzahl an SCEs als bei unbehandelten Kontrollen anderer Probanden feststellen.

Die Anzahl der SCEs stellen einen Indikator für den Schaden einer Zelle und somit für die Reparaturkapazität eines Menschen dar. Wie man durch Behandlung mit BPDE erkennen kann, nimmt die Zahl an SCEs durch Schädigungen der DNA zu. Demnach

müssten Personen, die aufgrund einer geringen individuellen Reparaturkapazität viele Neurofibrome ausbilden, eine entsprechend hohe Anzahl an SCEs aufweisen.

Ob es zwischen diesen Ergebnissen ein Zusammenhang mit der Anzahl an Neurofibromen eines jeden einzelnen Patienten gibt, wird am Ende des Ergebnisteiles ausführlich erläutert und dargestellt.

3.4 Mitotic Delay-Test

3.4.1 Etablierung des Mitotic Delay-Tests an Fibroblastenkulturen

Dieser Zellzyklusverschiebungstest sollte zu Beginn der Arbeit an Fibroblastenkulturen durchgeführt werden, wodurch in einer Reihe von Vorversuchen die optimalen Inkubationszeiten der Kulturen etabliert werden mussten.

Da sich die zur Verfügung stehenden Zellen in ihren Teilungsraten sehr stark unterschieden, war es äußerst schwierig geeignete Inkubationszeiten zu finden, die an alle Zelllinien angepasst waren. Zudem verlangsamten sich die Zelllinien mit der Zeit immer mehr, sodass sich diese nach mehreren Etablierungsversuchen auf ein sehr langsames Wachstum eingestellt hatten und uns dadurch nur noch eine sehr geringe Anzahl an Zellen zur Verfügung stand.

Dadurch war es nicht möglich, plausible und vor allem reproduzierbare Ergebnisse bei diesem Test – unter Verwendung von Fibroblastenkulturen – zu erzielen.

3.4.2 Mitotic Delay-Test an Lymphozytenkulturen

Auch die Durchführung dieses Tests wurde bereits im Vorfeld an Lymphozytenkulturen etabliert. Die Strahlungs-dosis von 2 Gy, sowie die anschließende Inkubationszeit von 18 h, welche die deutlichste Verschiebung des Zellzyklus aufzeigte, wurden aus dem bereits etablierten Protokoll übernommen. Der genaue Versuchsablauf kann in Kapitel 2.2 4 nachgelesen werden. Die schematische Darstellung des Mitotic Delay-Test ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

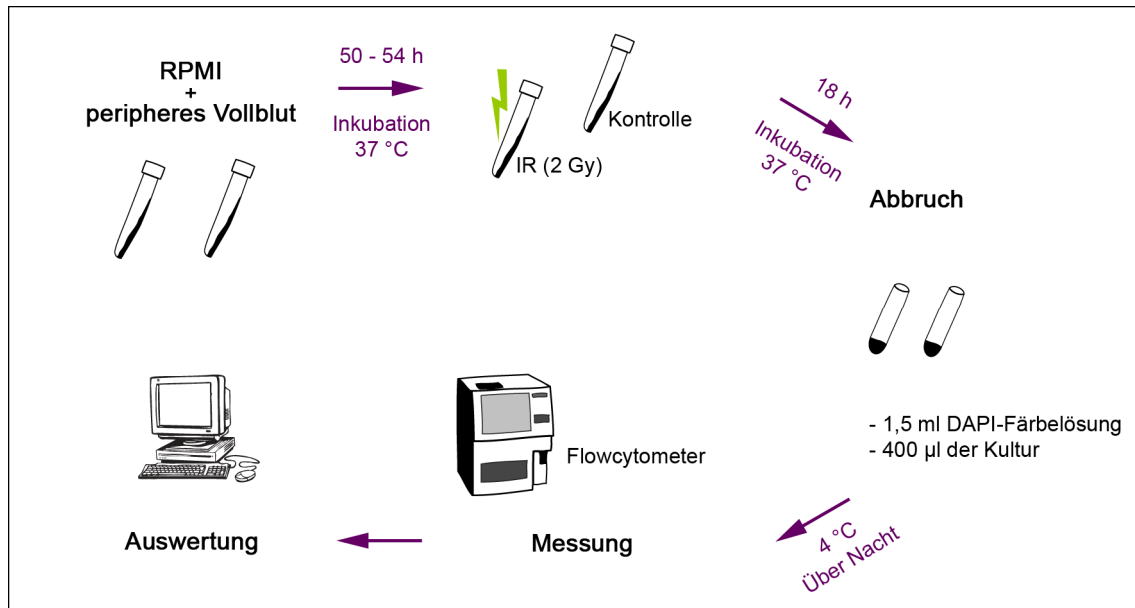


Abbildung 3.11: Schematischer Ablauf des Mitotic Delay-Tests

Der MD Index beschreibt das Verhältnis der G2- zur S-Phase zweier unterschiedlich behandelter Proben und somit die mitotische Verschiebung des Zellzyklus.

Um den MD Index berechnen zu können, müssen die einzelnen Zellzyklusphasen definiert werden.

In der folgenden Abbildung ist das Histogramm dargestellt, welches durch Messung mit einem Flowcytometer erhalten wird.

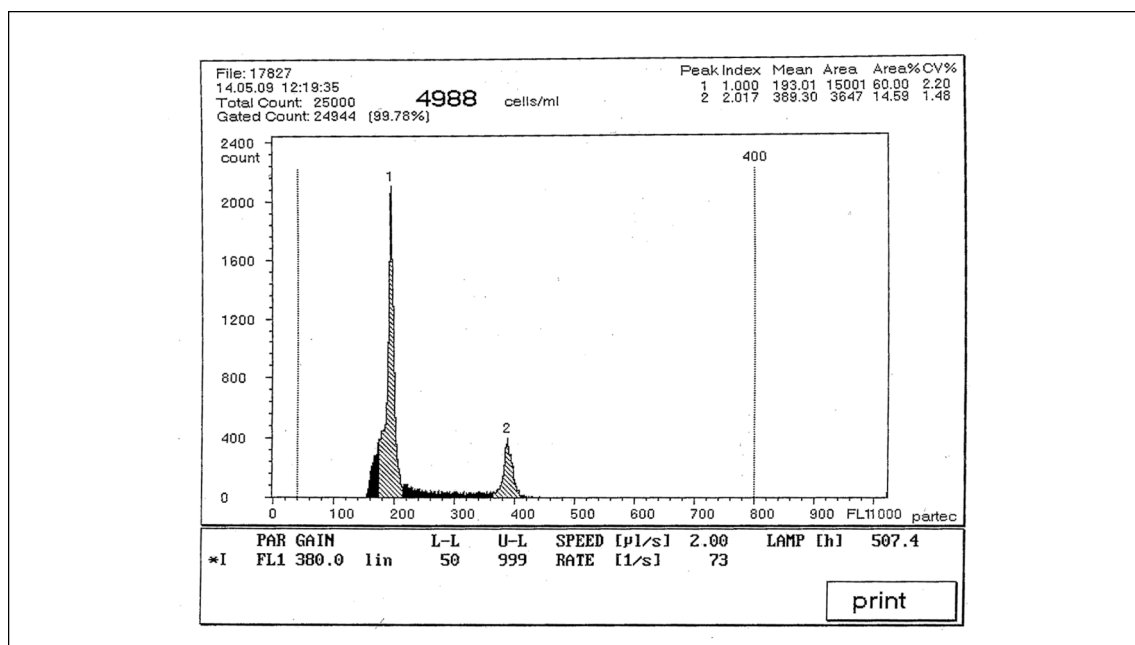


Abbildung 3.12: Histogramm nach Messung mit einem Flowcytometer. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Zellzyklusphasen der gemessenen Zellen. Nach Abgrenzung der Phasen kann der MD Index errechnet werden.

Der MD Index errechnet dabei sich wie folgt:

$$\text{MD Index} = (G2/S_{\text{spontan}}) / (G2/S_{\text{induziert}})$$

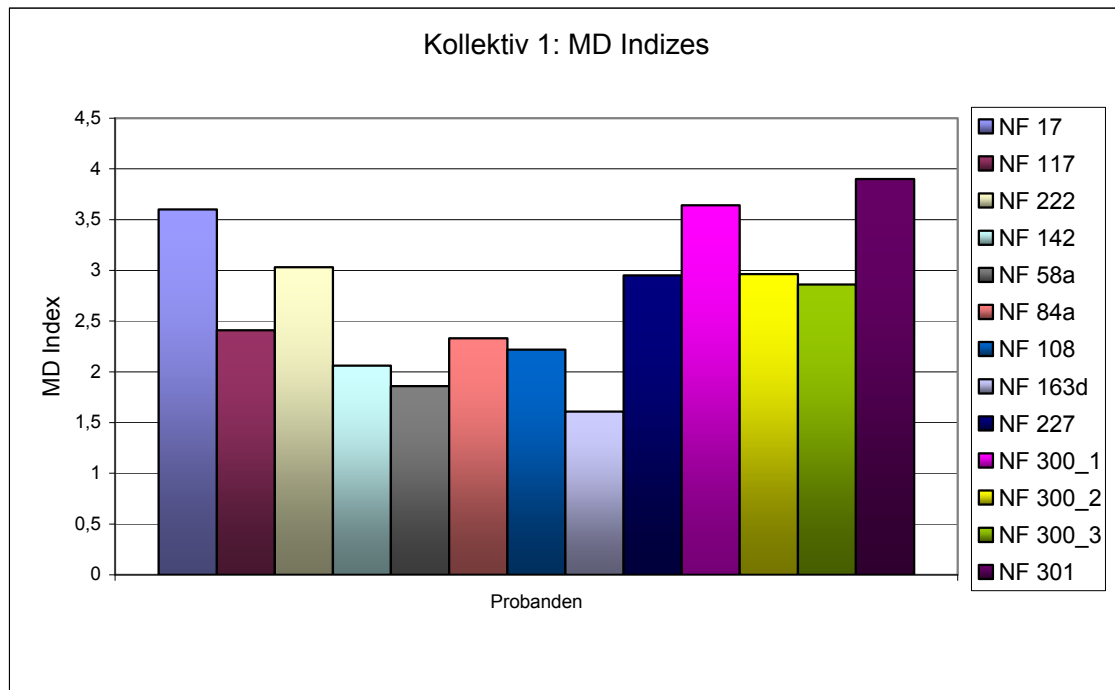


Abbildung 3.13: MD Indizes der Lymphozytenkulturen von Kollektiv 1.

Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy.

In Abbildung 3.13 sind die einzelnen MD Indizes der Probanden aus Kollektiv 1 graphisch dargestellt. Die Werte der MD Indizes reichen von 1,61 bis 3,90 und sind ein Maß für die mitotische Verschiebung des Zellzyklus. Je größer der MD Index, desto größer auch die mitotische Verschiebung. Demnach gibt der errechnete MD Index Auskunft darüber, wie lange eine Zelle am Übergang der G2-Phase zur M-Phase verweilt, um den induzierten Schaden zu reparieren. Reparaturvorgänge können so durch diesen Test angezeigt werden. Vergleicht man nun die MD Indizes der Abbildung 3.13 miteinander, so kann man aufgrund der unterschiedlichen Werte auf Unterschiede in der Reparaturkapazität der untersuchten Probanden schließen. Ein beispielsweise sehr hoher MD Index spiegelt einen sehr langen Reparaturvorgang wieder, der auf eine geringe DNA-Reparaturkapazität schließen lässt. Ein sehr geringer MD Index hingegen könnte auf einen Zellzyklusdefekt zurückzuführen sein, wodurch die Zellen unkontrolliert und ohne Reparatur des DNA-Schadens in die M-Phase übergehen und so das geschädigte Erbgut an ihre Tochterzellen weitergeben.

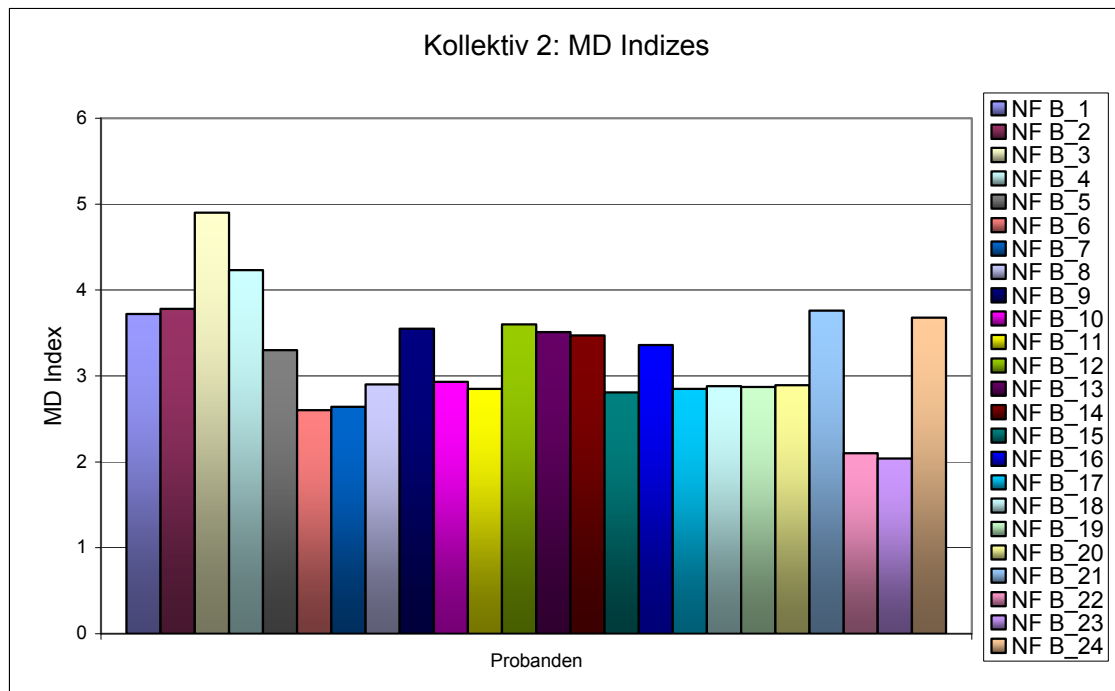


Abbildung 3.14: MD Indizes der Lymphozytenkulturen von Kollektiv 2.
Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy.

Abbildung 3.14 zeigt die MD Indizes der 24 Probanden aus Kollektiv 2. Wie erwartet, gibt es auch hier deutliche Unterschiede bezüglich der Reaktion des Zellzyklus auf den induzierten Schaden. Die mitotische Verschiebung des Zellzyklus von NF B_3 beispielsweise ist gegenüber den Anderen mit einem Wert von 4,90 auffallend hoch. Die geringste Verzögerung weist Proband NF B_23 mit einem MD Index von 2,04 auf.

Da diese Werte ein Indikator für die DNA Reparaturkapazität eines jeden einzelnen Menschen darstellen, soll auch anhand dieser Ergebnisse ein Zusammenhang mit der Anzahl an Neurofibromen am Ende des Ergebnisteils überprüft werden.

3.5 Mikronukleus-Test

3.5.1 Etablierung des Mikronukleus-Tests an Fibroblastenkulturen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht, die Durchführung des Mikronukleus-Tests an Fibroblastenkulturen zu etablieren. Im Laufe der Etablierungsversuche wurden die Inkubationszeiten der Kulturen, sowie die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien variiert, um so die Versuchsbedingungen so gut wie möglich an das Wachstum der Zellen anzupassen. Es konnten jedoch keine konstanten Mikronuklei-Raten (MN-Raten), welche die Anzahl an Mikronuklei pro 1.000 binukleären Zellen darstellen, erzielt werden. Sowohl die MN-Rate der spontanen, als auch die der induzierten Kulturen waren mit einer durchschnittlichen MN-Rate von deutlich weniger als 10 im Vergleich zu anderen Zelltypen extrem niedrig. Aufgrund der allgemein niedrigen MN-Rate ließ sich auch, anders als erwartet, kein Unterschied zwischen spontanen und induzierten Kulturen erkennen.

Da sich die verwendeten Fibroblastenkulturen im Allgemeinen sehr langsam und ungleichmäßig teilten, waren sie für diese Versuchsdurchführung äußerst ungeeignet. Um im weiteren Verlauf die Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zelllinien berücksichtigen zu können, wurde der gängige Versuchsablauf des Mikronukleus-Tests modifiziert.

3.5.2 Modifikation des Mikronukleus-Tests

Im Zuge der Modifikation wurde als wesentliche Veränderung ein BrdU basierter Proliferationsnachweis in den Versuch mit integriert. Diese Modifikation ermöglichte es, ausschließlich proliferierende, also jene Zellen auszuwerten, welche aus einer Zellteilung in Anwesenheit von BrdU hervorgegangen waren. Aufgrund dieser Unterscheidungsmöglichkeit konnte eine vermeintlich geringe MN-Rate, welche aufgrund langsamer Proliferation entstanden war, ausgeschlossen werden.

Der Versuchsdurchführung des modifizierten Mikronukleus-Tests wie sie letztendlich in Kapitel 2.2.6 beschrieben ist, gingen ein paar Etablierungsversuche voraus.

Die beim Vorversuch verwendete BrdU-Endkonzentration von 30 µg/ml erwies sich als zu hoch, da ein zu hoher BrdU-Anteil im Medium den Nukleotid-Pool einer Zelle aus dem Gleichgewicht bringen kann und dadurch zu einem unklaren Ergebnis führen könnte. Die in den darauf folgenden Versuchen verwendete BrdU-Endkonzentration von 15 µg/ml erwies sich als angemessen und wurde in die endgültige Versuchsdurchführung übernommen. Auf die Zugabe von Cytochalasin B wurde gänzlich verzichtet, da durch die Behandlung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper ausschließlich Mikrokerne einer sich in Anwesenheit von BrdU geteilten Zelle durch einen Filter sichtbar gemacht werden konnten.

Die Inkubationszeiten nach Bestrahlung der induzierten Kulturen und somit nach Zugabe von BrdU zu beiden Kulturen variierten aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen 72 h und 96 h.

Um wiederum die Reparaturkapazität unterschiedlicher Probanden untersuchen zu können, wurde auch dieser Versuch an Fibroblastenkulturen zweier Gruppen unterschiedlich stark betroffener Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 durchgeführt.

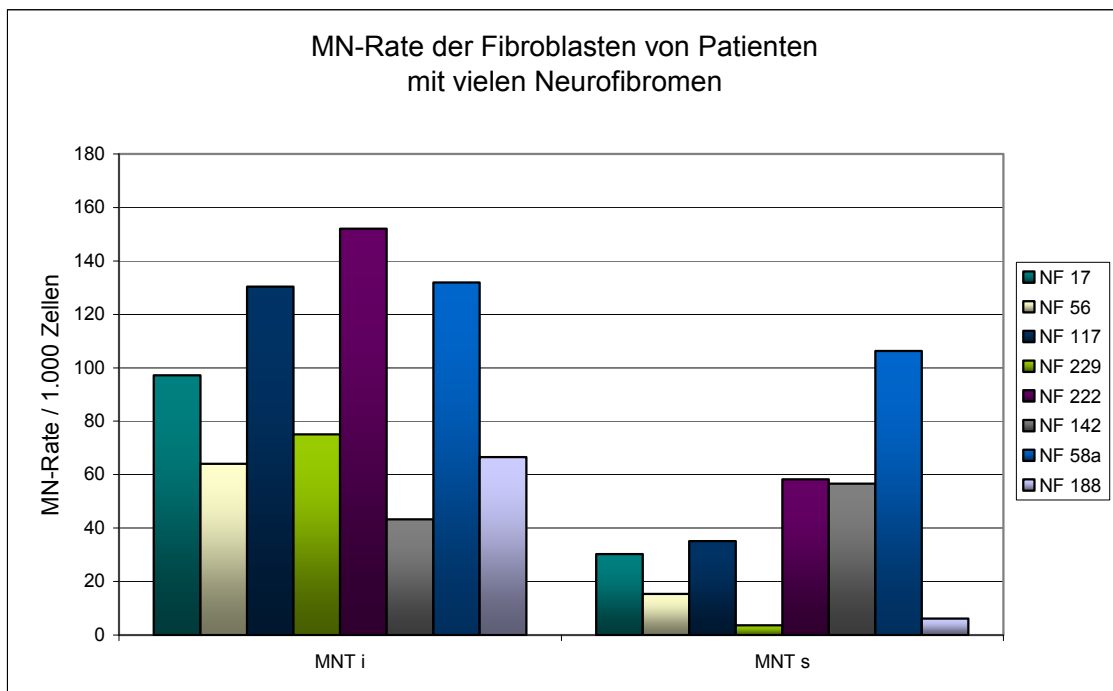


Abbildung 3.15: MN-Raten der strahlungsinduzierten und spontanen Fibroblastenkulturen von Patienten mit vielen Neurofibromen. Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy. Die dargestellten MN-Raten beziehen sich ausschließlich auf die Auszählung der BrdU-markierten Zellen.

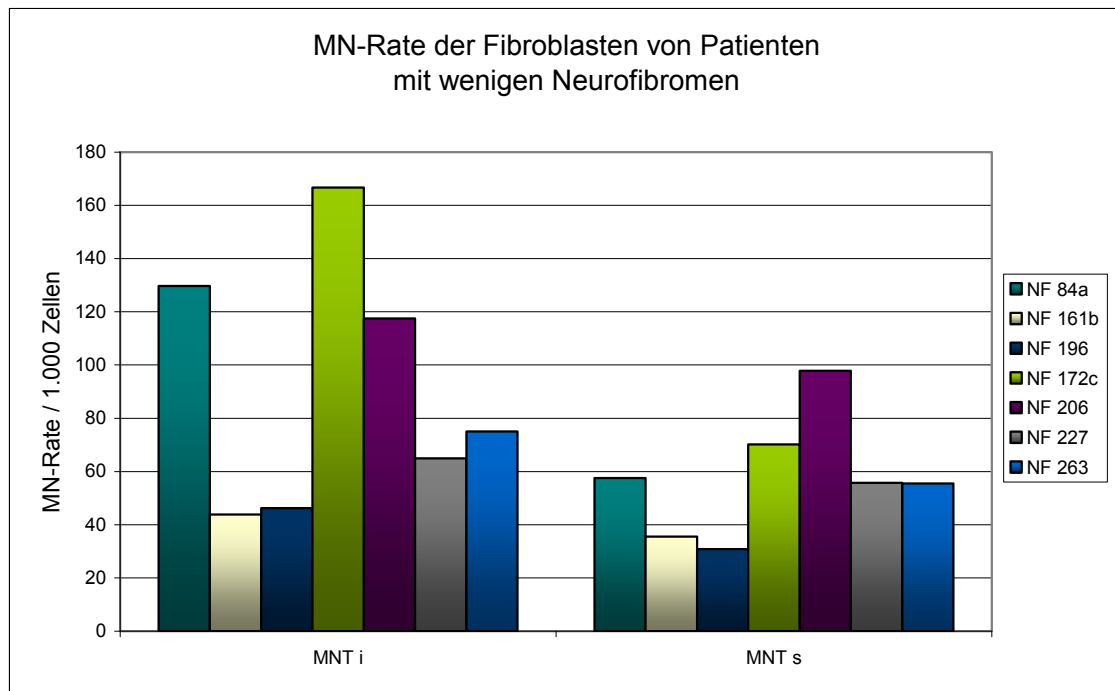


Abbildung 3.16: MN-Raten der strahlungsinduzierten und spontanen Fibroblastenkulturen von Patienten mit wenigen Neurofibromen. Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy. Die dargestellten MN-Raten beziehen sich ausschließlich auf die Auszählung der BrdU-markierten Zellen.

Wie man aus den beiden Abbildungen 3.15 und 3.16 erkennen kann, variieren die MN-Raten der einzelnen Fibroblastenkulturen sehr stark. Auch zwischen den beiden Patientengruppen kann man keine wesentlichen Unterschiede erkennen, denn auch hier gibt es sehr große Schwankungen innerhalb der jeweiligen Gruppe. In beiden Gruppen treten bei den induzierten und spontanen Kulturen sowohl sehr hohe, als auch sehr niedrige MN-Raten auf. Vor allem aber die spontanen Kulturen der Patienten mit vielen Neurofibromen weisen eine extrem breite Streuung Ihrer Werte auf, da bei zwei der Kulturen NF 229 und NF 188 kaum ein verbleibender Schaden angezeigt wurde.

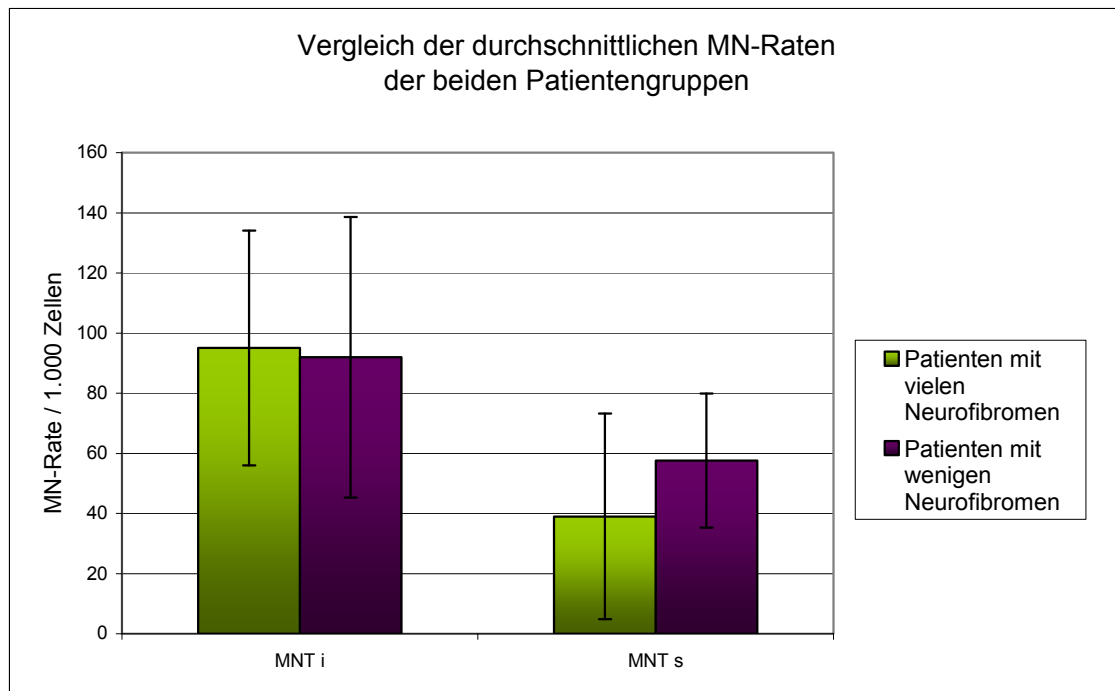


Abbildung 3.17: Mittelwerte der MN-Raten der jeweils unterschiedlichen Patientengruppen.
Dargestellt sind die Mittelwerte der strahlungsinduzierten und spontanen Kulturen beider Gruppen

Betrachtet man die Mittelwerte der beiden Gruppen in Abbildung 3.17 so kann man auch hier keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Die Mittelwerte der MN-Raten der induzierten Kulturen sind beinahe gleich und weisen auch in beiden Gruppen eine sehr hohe Standardabweichung auf. Bei den spontanen Kulturen sind leichte Schwankungen zu erkennen, vor allem die zuvor erwähnten Ausreißer der Gruppe mit vielen Neurofibromen haben hier großen Einfluss auf die Standardabweichung. Zusammenfassend kann in diesem Versuchsansatz kein Unterschied zwischen den Mittelwerten der MN-Raten der unterschiedlichen Fibroblastenkulturen aufgezeigt werden.

3.5.3 Proliferationsindex der Fibroblastenkulturen

Im Zuge des abgeänderten Mikronukleus-Tests war es möglich, die Proliferationsrate der einzelnen Zelllinien zu bestimmen. Aufgrund der Behandlung durch einen mit Fluorescein markierten Zweitantikörper, sowie der Gegenfärbung aller Zellkerne durch DAPI, konnten proliferierende von nicht proliferierenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop durch Verwendung zweier Filter unterschieden werden.

Die Präparate wurden daher in zwei aufeinander folgenden Durchgängen am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt, sodass im Anschluss daran die Proliferationsrate bestimmt werden konnte. Dabei entsprach die Anzahl der Zellen, welche mit dem DAPI-Filter ausgezählt wurden 100 %. Nach Auszählung mit einem FITC-Filter konnte somit der prozentuale Anteil an Zellen ermittelt werden, welche nach Einbau von BrdU die S-Phase durchlaufen hatten.

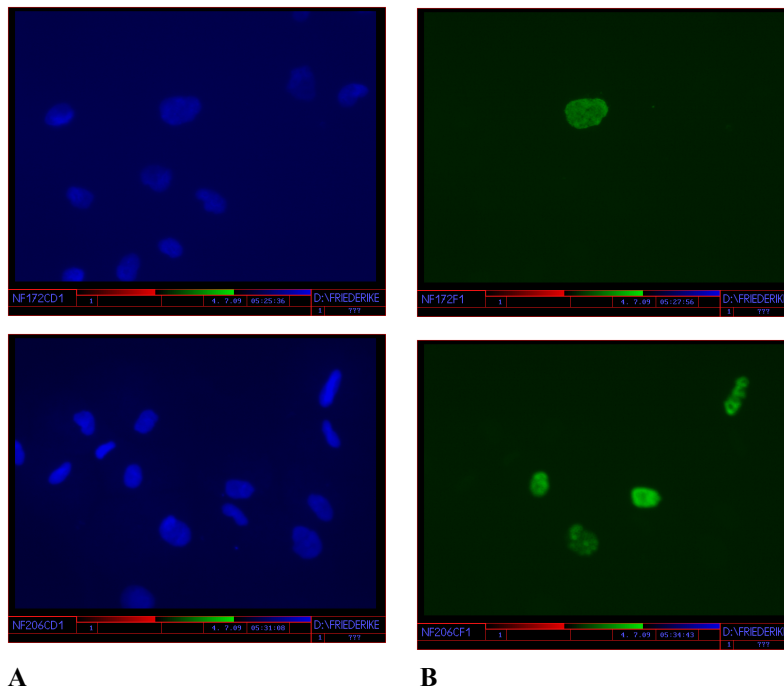


Abbildung 3.18: Vergleichende Darstellung eines Präparats mit zwei verschiedenen Filtern.

Dargestellt sind zwei identische Ausschnitte eines induzierten Präparats des proliferationsabhängigen MNT-Tests an Fibroblasten, aufgenommen mit einem DAPI-Filter (Bild A) und einem FITC-Filter (Bild B).

Wie man an der Abbildung 3.18 erkennen kann, nimmt die Bestrahlung einen großen Einfluss auf den Proliferationsindex der Fibroblastenkulturen. An dem mit dem FITC-Filter aufgenommenen Ausschnitt haben deutlich weniger Zellen die S-Phase in Anwesenheit von BrdU durchlaufen. Im Gegensatz dazu stehen die Zellen, die mit DAPI markiert sind und durch einen entsprechenden Filter sichtbar gemacht werden können.

Im Folgenden sollen die jeweiligen Proliferationsindizes graphisch dargestellt und erläutert werden.

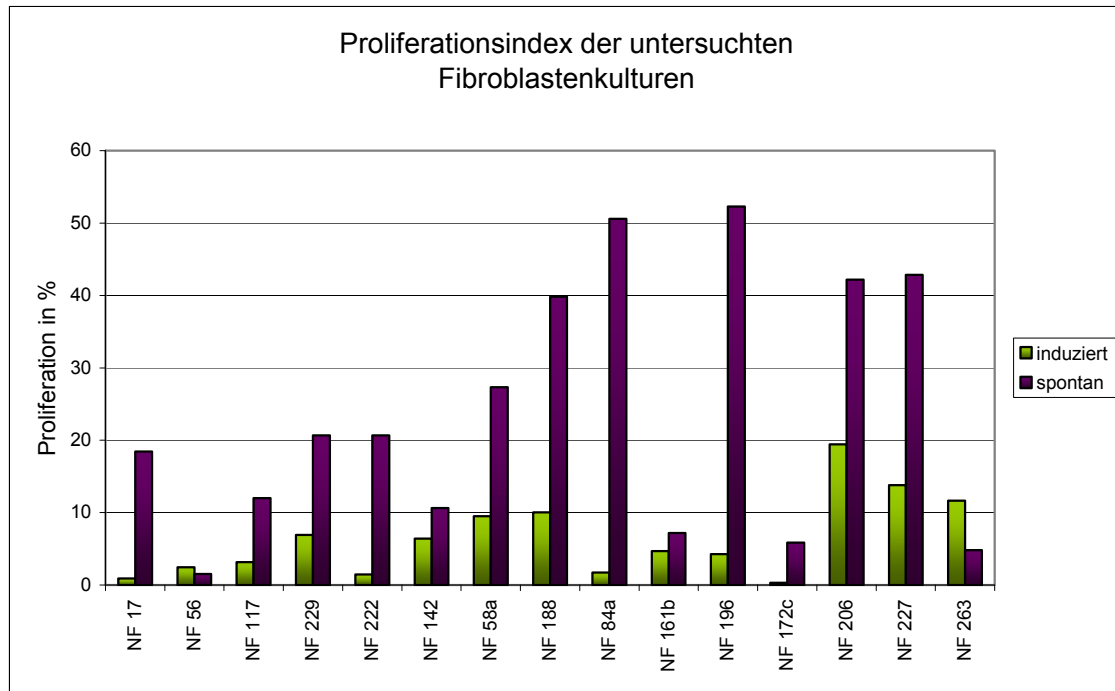


Abbildung 3.19: Proliferationsindex der untersuchten Fibroblastenkulturen. Dargestellt sind die Proliferationsindizes der strahlungsinduzierten und spontanen Fibroblastenkulturen. Die Indizes resultieren aus einer BrdU-Behandlung mit anschließender Auszählung unter Verwendung zweier Filter (DAPI und FITC).

Wie man der Abbildung 3.19 entnehmen kann, unterscheiden sich die verschiedenen Zelllinien zum Teil sehr stark in Ihrer Teilungsrate. Dies bestätigt die Wichtigkeit einen Proliferationsnachweis in den Versuch mit eingebaut zu haben. Eine wichtige Erkenntnis, die man aus diesem Versuch gewinnen konnte, ist die drastische Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit durch ionisierende Strahlung. Ein Rückgang des Wachstums nach Bestrahlung mit 2 Gy ist deutlich an allen Zelllinien zu erkennen, wirkt sich jedoch nicht an allen gleich stark aus. Bei der Zelllinie NF 172c beispielsweise sinkt die Proliferationsrate auf einen Wert von 0,32 %, was bei einer Inkubationszeit von 72 h nach Bestrahlung beinahe einem absoluten Wachstumsstillstand ähnelt. Aber auch Zelllinien, wie beispielsweise NF 84a und NF 196 mit einem spontanen Wachstum von 50,56 % und 52,31 % kamen nach Bestrahlung und anschließender Inkubationszeit von 96 h bzw. 72 h gerade mal auf ein Wachstum von 1,71 % und 4,24 %. Aufgrund der stark zurückgegangenen Teilungsraten nach Bestrahlung, scheinen die Fibroblasten für diesen Versuch nicht geeignet zu sein. Die Aussagekraft der Ergebnisse eines proliferationsabhängigen Versuches, welcher an solch langsam wachsenden Kulturen durchgeführt wurde ist sehr gering und somit für die Fragestellung dieser Arbeit nicht ausreichend.

3.5.4 Mikronukleus-Test an Lymphozytenkulturen

Da die Ergebnisse der vorangegangenen Tests mit Fibroblasten eher unzuverlässig und unzureichend erschienen, wurde der Mikronukleus-Test an den dafür zur Verfügung gestellten Lymphozytenkulturen zweier Kollektive durchgeführt.

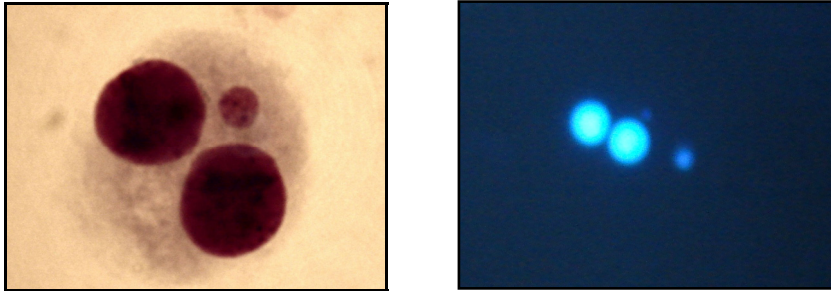


Abbildung 3.20: Binukleäre Zellen mit Mikronuklei.

Das erste Bild zeigt ein mit Giemsa gefärbtes Präparat mit einer binukleären Zelle und einem Mikronukleus.
Im zweiten Bild ist ein mit DAPI-gefärbtes Präparat dargestellt, welches eine binukleäre Zelle mit zwei Mikronuklei aufweist.

Dem Versuchsablauf, wie er an diesen Kulturen angewendet wurde, ging eine Reihe von Etablierungsversuchen voraus. Bei dieser Etablierung wurden Strahlungsdosis, Endkonzentration von Cyt B und vor allem die unterschiedlichen Inkubationszeiten optimal auf die Wachstumsbedingungen der Lymphozytenkulturen angepasst. Das auf dieser Etablierung basierte Protokoll wurde in Kapitel 2.2.5 ausreichend beschrieben. Der schematische Ablauf des Versuchs ist in Abb. 3.21 dargestellt.

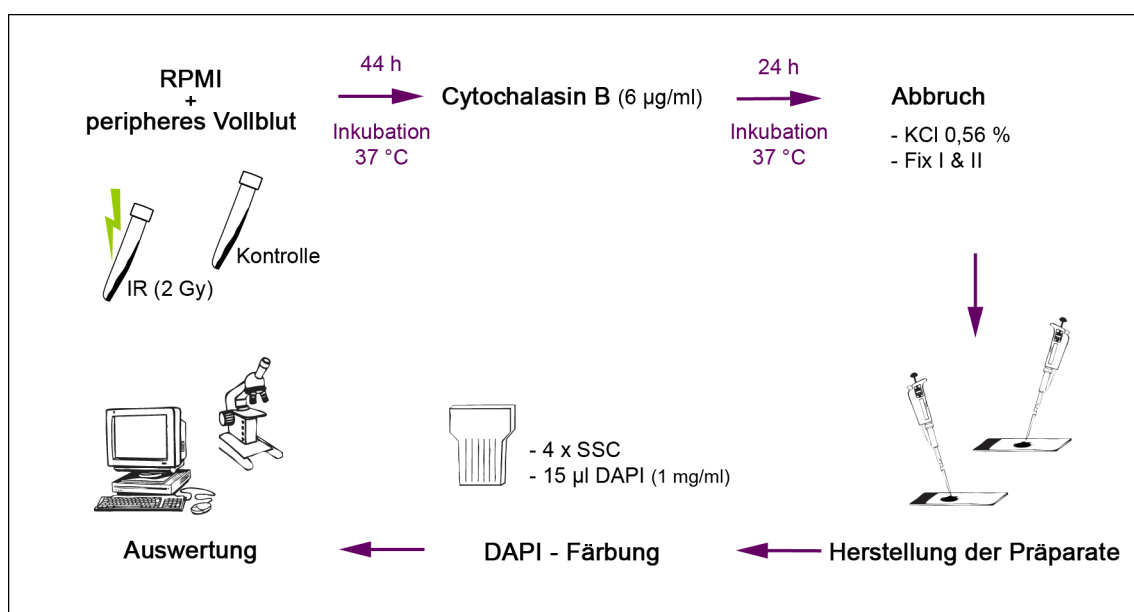


Abbildung 3.21: Schematischer Ablauf des MNT-Tests an Lymphozytenkulturen.

Nachdem sowohl die induzierten, als auch spontanen Kulturen 44 h inkubiert waren, wurde zu jeder Kultur 15 µl des Zytokinese Blockers Cytochalasin B zugegeben, um im Anschluss daran weitere 24 h inkubiert zu werden. Nach Abbruch der Kulturen und Herstellen der Präparate wurden diese an einem automatisierten Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Dabei wurde die MN-Rate, d.h. die Anzahl an Mikrokernen pro 1.000 binukleäre Zellen, ermittelt.



Abbildung3.22: Ergebnisse der automatisierten Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt ist die Anzahl an binukleären Zellen, sowie deren Mikronuklei einer bestrahlten Lymphozytenkultur.

Durch die Auswertung am automatisierten Fluoreszenzmikroskop, erhält man die Gesamtzahl an binukleären Zellen des Präparats, sowie deren Mikronuklei. Dabei können die Zellen nach der Anzahl an Mikronuklei sortiert werden und gegebenenfalls manuell auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

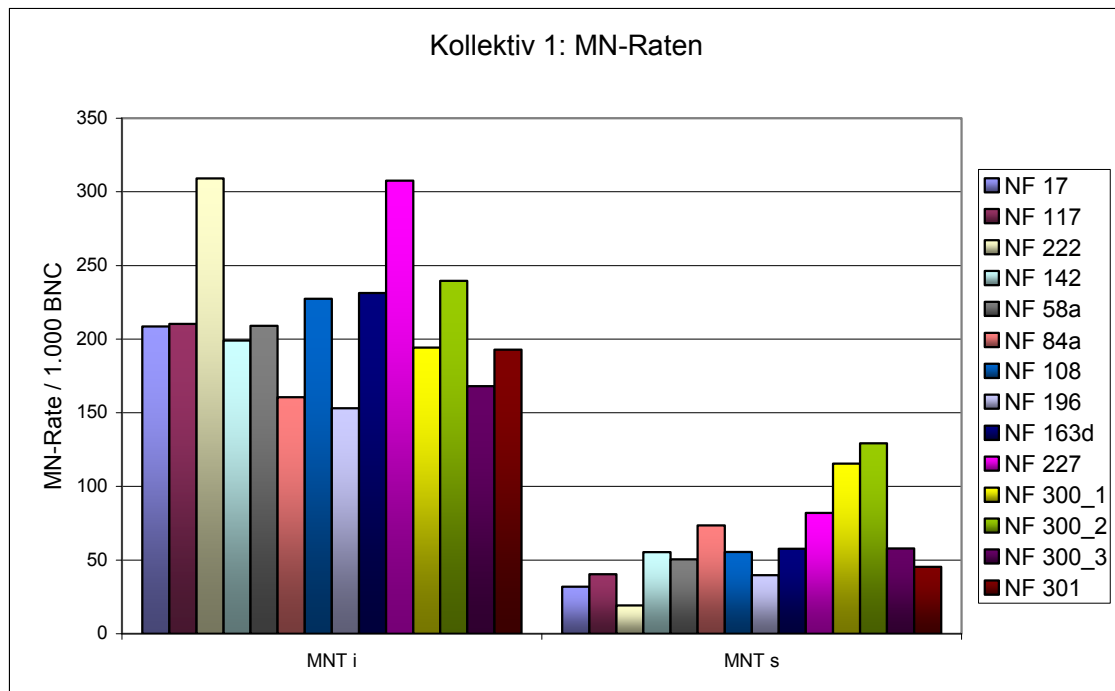


Abbildung 3.23: MN-Raten der strahlungsinduzierten und spontanen Lymphozytenkulturen von Kollektiv 1. Dargestellt ist die Anzahl an Mikronuklei pro 1.000 binukleäre Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy.

Bei den in Abbildung 3.23 dargestellten MN-Raten kann man einen eindeutigen Unterschied zwischen den induzierten und spontanen Kulturen erkennen. Nicht reparierte Schäden welche als chromosomale Fragmente verbleiben treten bei der Zellteilung in Form von Mikronuklei aus der Zelle hervor. Aus diesem Grund lässt sich bei den durch ionisierende Strahlung geschädigten Zellen eine deutlich höhere MN-Rate gegenüber den unbehandelten, spontanen Kulturen erkennen. Mit Ausnahme der zwei Ausreißer NF 300_1 und NF 300_2, welche eine spontane MN-Rate von über 100 aufweisen, erreichen die spontanen Kulturen einen Mittelwert von 50,75 MN/1.000 BNC. Trotz der beiden erhöhten Werte liegt Kollektiv 1 mit einer durchschnittlichen MN-Rate von 60,98 MN/1.000 BNC absolut im Normalbereich. Die Werte der induzierten MN-Raten reichen von 153,19 bis 309,11 MN/1.000 BNC und weisen daher auf Unterschiede in der Reparaturkapazität der Probanden hin.

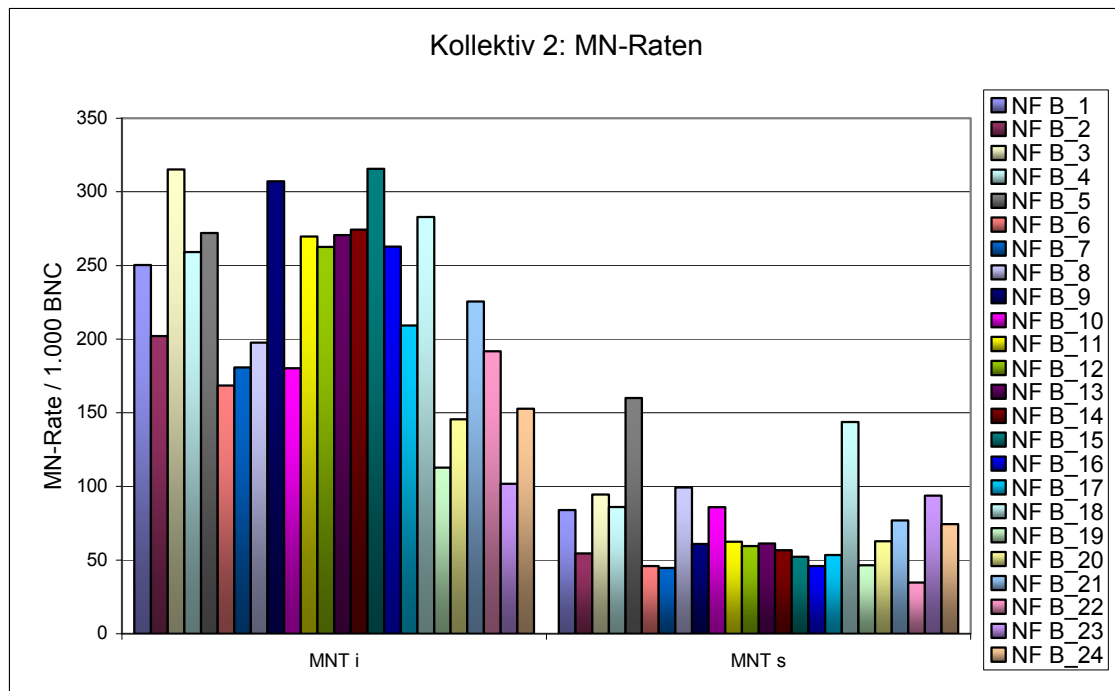


Abbildung 3.24: MN-Raten der strahlungsinduzierten und spontanen Lymphozytenkulturen von Kollektiv 2. Dargestellt ist die Anzahl an Mikronuklei pro 1.000 binukleäre Zellen. Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy.

Wie man auch in Abbildung 3.24 auf den ersten Blick erkennen kann, liegen die spontanen MN-Raten des zweiten Kollektivs deutlich unter den induzierten MN-Raten. Hier jedoch scheinen die spontanen MN-Raten mit Werten von 34,76 bis 159,98 allgemein etwas höher zu sein. Wie man sieht grenzen sich vor allem die Werte der Probanden NF B_5 und NF B_18, welche eine MN-Rate von weit mehr als 100 besitzen stark von den anderen ab. Mit Werten von 159,98 und 143,64 MN/1.000 BNC erscheinen diese bei einem Mittelwert von 72,48 MN/1.000 BNC recht hoch zu sein. Mit Ausnahme der beiden Ausreißer senkt sich der Mittelwert auf 65,27 MN/1.000 BNC, wobei auch dieser Wert im Vergleich zu Kollektiv 1 erhöht erscheint. Dennoch kann auch der Mittelwert der spontanen MN-Rate mit einem Wert von 72,48 MN/1.000 BNC dieses Kollektivs noch im Normalbereich angesiedelt werden. Betrachtet man die dazugehörigen induzierten MN-Raten der beiden Ausreißer, so kann man auch hier relativ hohe Werte erkennen. Diese sind zwar im Vergleich zu den spontanen MN-Raten nicht die höchsten, liegen aber dennoch mit Werten von 272,05 bei B_5 und 282,91 bei B_18 deutlich über dem Mittelwert von 225,47 MN/1.000 BNC. Die Werte der induzierten MN-Raten dieses Kollektivs im Allgemeinen betrachtet reichen von 101,75 bis 315,68 MN/1.000 BNC.

Auffallend sind beispielsweise auch die Werte des Probanden NF B_23, dessen Differenz der induzierten und spontanen MN-Rate sehr gering ausfällt. Bei einer als relativ hoch ansehbaren spontanen MN-Rate von 93,82 weist dieser Proband die niedrigste aller induzierten MN-Raten von 101,75 MN/1.000 BNC auf.

Diese Unterschiede der induzierten MN-Raten weisen auf unterschiedliche Reparaturkapazitäten der untersuchten Probanden hin. Die kultivierten Lymphozyten waren in der Lage, den gezielt gesetzten Schaden durch Bestrahlung unterschiedlich effektiv zu reparieren. Inwiefern diese Reparaturkapazität in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung steht, soll im Folgenden genauer erläutert werden.

3.6 Statistische Auswertung

3.6.1 Vergleich zweier Patientengruppen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Reparaturtests, welche an Lymphozytenkulturen durchgeführt wurden, dargestellt. (Einteilung der Gruppen siehe Tabelle 3.1).

- Schwesterchromatidaustausch-Test

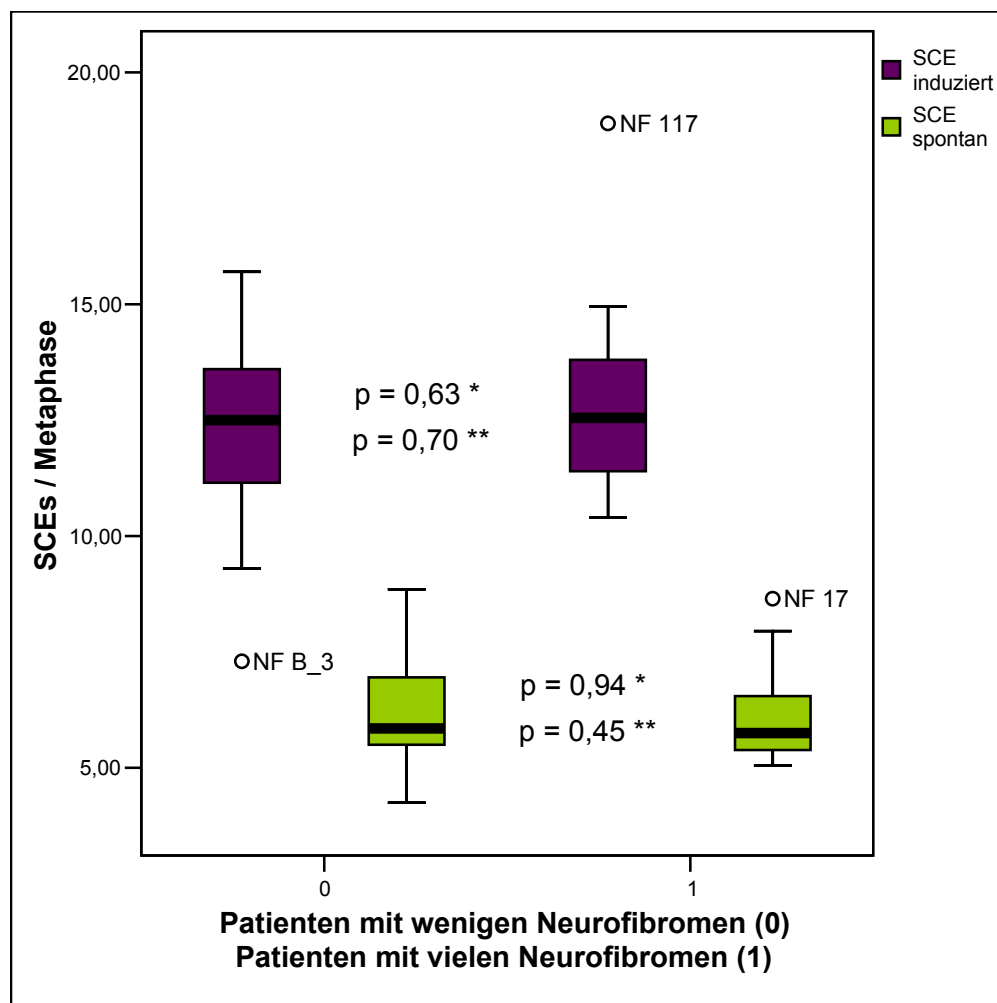


Abbildung 3.25: Zusammenfassende Darstellung der induzierten und spontanen SCE-Raten, sowie deren Verteilung in Form von Boxplots. Dargestellt sind dabei die Mediane, sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die Boxplots sind durch das 1. und 3. Quartil gekennzeichnet. Extremwerte sind besonders gekennzeichnet.

* Wilcoxon-Rangsummentest

** Logistische Regressionsanalyse adjustiert für Alter und Geschlecht

Wie man der Abbildung 3.25 entnehmen kann, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Die jeweils dargestellten Medianwerte – sowohl der induzierten, als auch der spontanen Werte – weisen beinahe den gleichen Wert auf.

- Mitotic Delay-Test

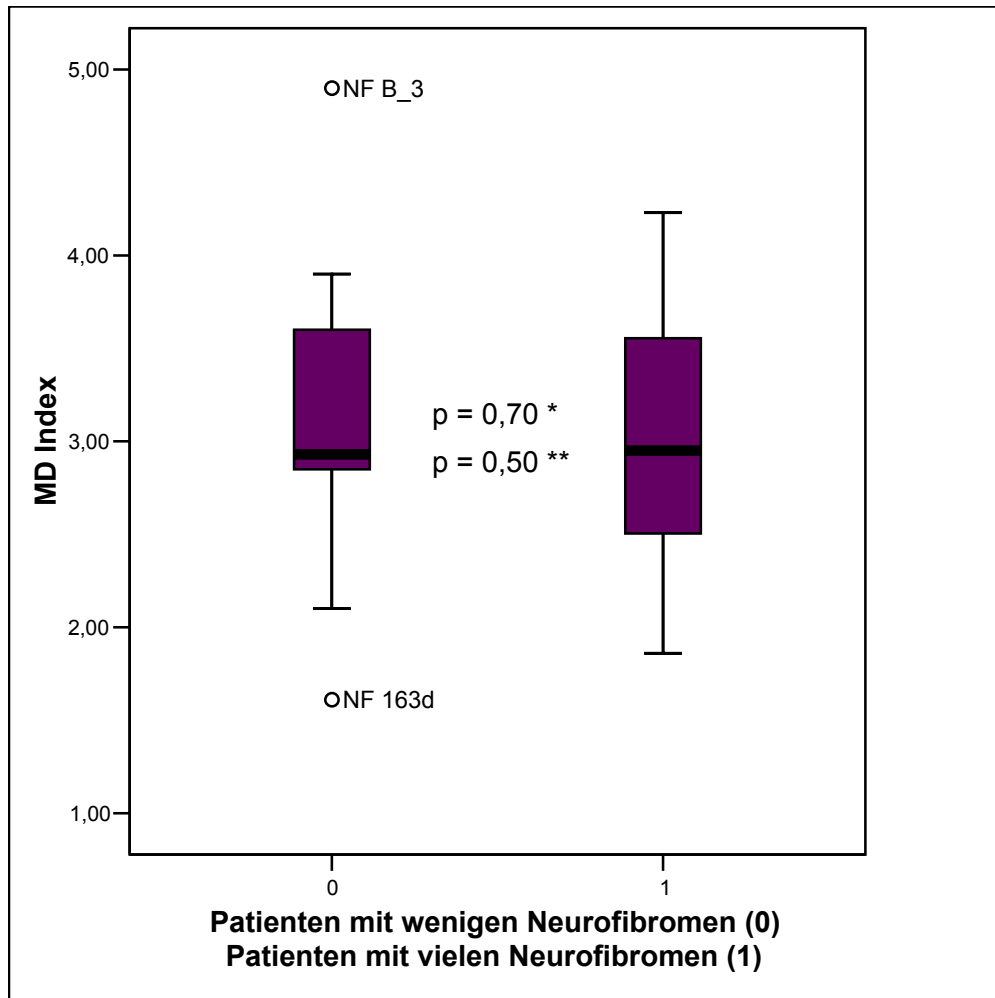


Abbildung 3.26: Zusammenfassende Darstellung der Verteilung aller MD Indizes in Form von Boxplots. Dargestellt sind dabei die Mediane, sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die Boxplots sind durch das 1. und 3. Quartil gekennzeichnet. Extremwerte sind besonders gekennzeichnet.

* Wilcoxon-Rangsummentest

** Logistische Regressionsanalyse adjustiert für Alter und Geschlecht

Auch bei der Untersuchung auf die Zellzyklusverschiebung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch bei diesem Test variieren die resultierenden Werte in den jeweiligen Gruppen recht stark, sodass sich in Bezug auf die interindividuelle DNA-Reparaturkapazität kein Trend zwischen den Gruppen erkennen lässt. Auffallend hierbei sind vor allem NF 163d und NF B_3, die jeweils mehr als 1,5 Kastenlängen vom 3. Quartil entfernt liegen und somit als Ausreißer zu betrachten sind.

• Mikronukleus-Test

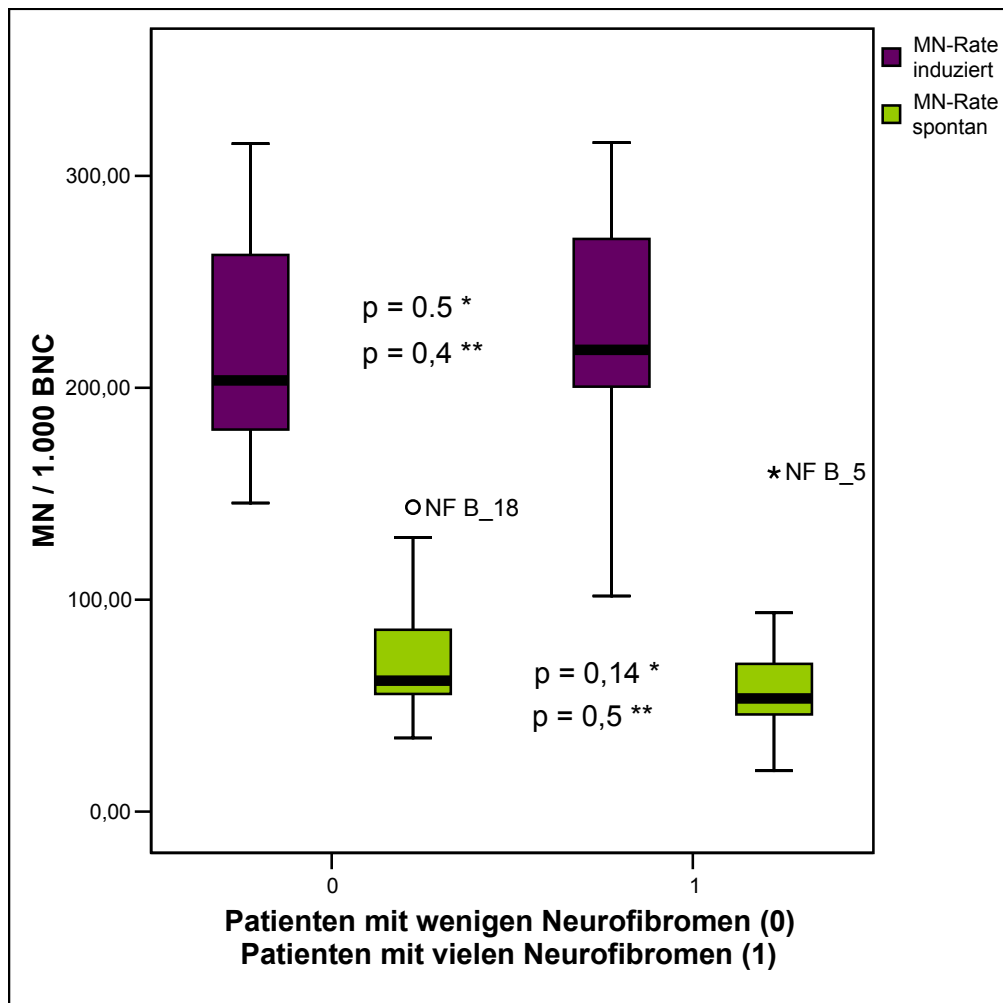


Abbildung 3.27: Zusammenfassende Darstellung der induzierten und spontanen MN-Raten, sowie deren Verteilung in Form von Boxplots. Dargestellt sind dabei die Mediane, sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die Boxplots sind durch das 1. und 3. Quartil gekennzeichnet. Extremwerte sind besonders gekennzeichnet.

* Wilcoxon-Rangsummentest

** Logistische Regressionsanalyse adjustiert für Alter und Geschlecht

Auch bei dem Mikronukleus-Test weisen die Ergebnisse der beiden Gruppen ganz offensichtlich keine signifikanten Unterschiede auf. Die Werte unterscheiden sich selbst innerhalb der Gruppe sehr stark und erbringen keinerlei Anzeichen auf etwaige Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Hier scheinen vor allem die Ergebnisse der unbehandelten Präparate innerhalb der beiden Gruppen sehr stark zu variieren. In beiden Gruppen sind Ausreißer zu erkennen, wobei NF B_5 mehr als 3 Kastenlängen vom 3. Quartil entfernt ist und dadurch diese sehr hohe MN-Rate als Extremwert angesehen werden kann.

3.6.2 Korrelation der Ergebnisse mit der Anzahl an Neurofibromen

Da zwischen den beiden Patientengruppen keine Unterschiede zu erkennen waren, soll im Folgenden der Zusammenhang zwischen der Anzahl an Neurofibromen und der jeweiligen Testergebnisse dargestellt werden.

- Schwesterchromatidaustausch-Test

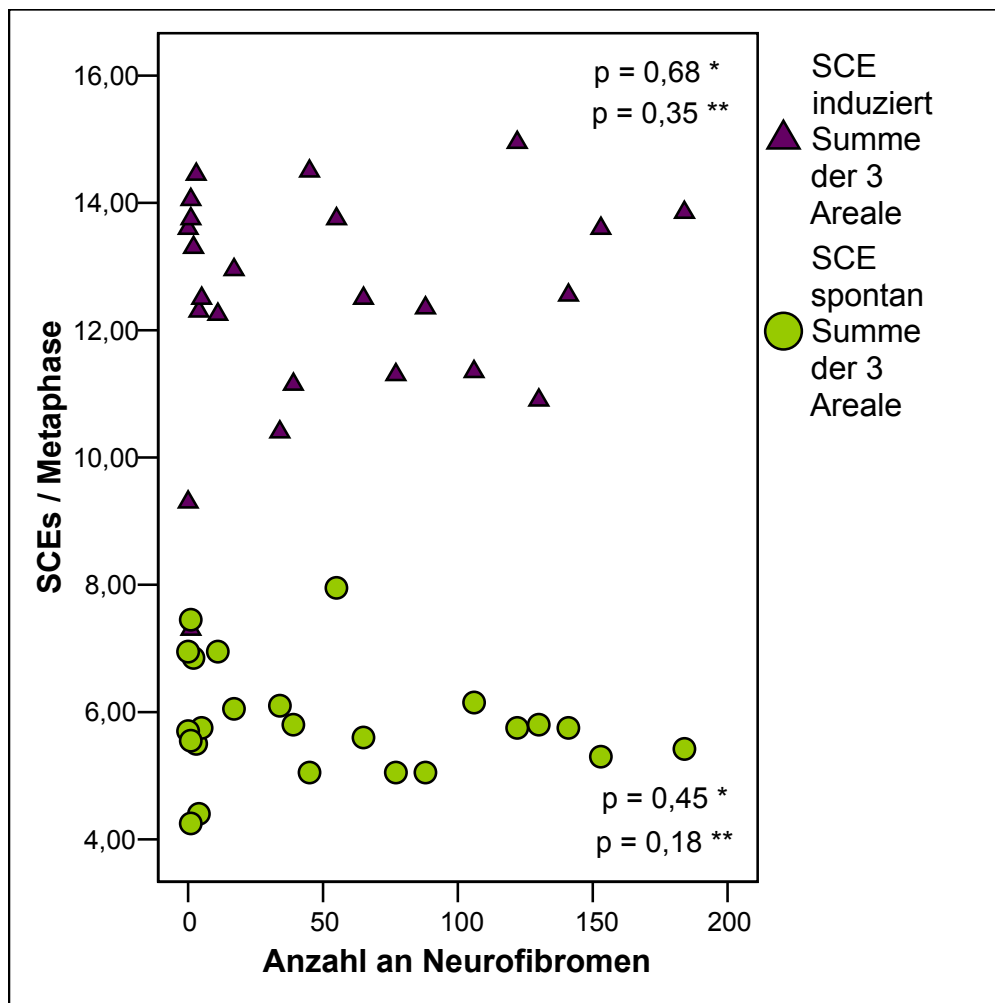


Abbildung 3.28: Verteilung der SCEs in Verbindung mit der Anzahl an Neurofibromen in Form eines Scatterplots.

* Spearman'sche Korrelationskoeffizient: 0,09 bzw. -0,16

** Partieller Korrelationskoeffizient nach Spearman adjustiert für Alter: 0,20 bzw. -0,29

In Abbildung 3.28 ist kein signifikanter Anstieg der Schwesterchromatidaustausche mit zunehmender Anzahl an Neurofibromen zu erkennen. Durch Verwendung des Alters als Kovariable steigt der Korrelationskoeffizient minimal an, jedoch kann hier keinesfalls von einer Korrelation der beiden Variablen gesprochen werden.

- Mitotic Delay-Test

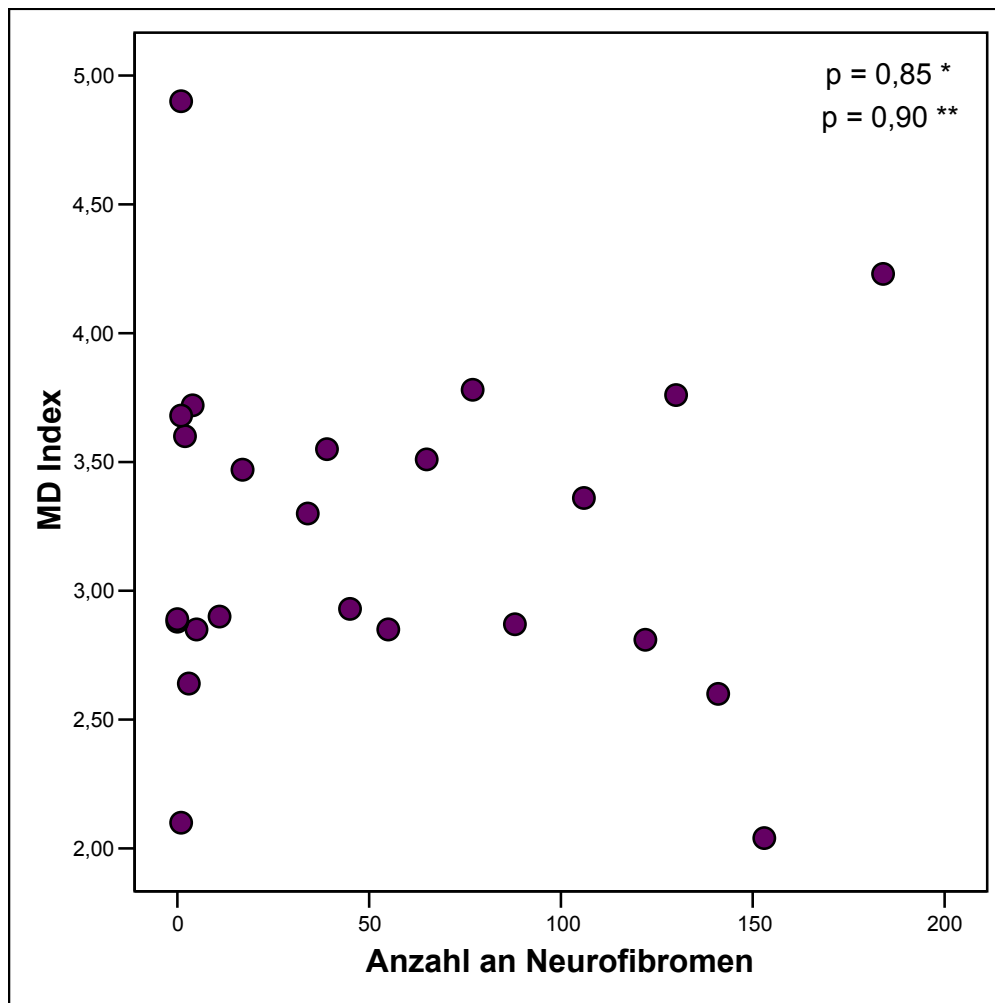


Abbildung 3.29: Verteilung der MD Indizes in Verbindung mit der Anzahl an Neurofibromen in Form eines Scatterplots.

* Spearman'sche Korrelationskoeffizient: -0,04

** Partieller Korrelationskoeffizient nach Spearman adjustiert für Alter: 0,03

Betrachtet man die unterschiedlichen MD Indizes der Patienten, so kann auch bei diesem Reparaturtest keine Korrelation festgestellt werden. Wie man in Abbildung 3.29 erkennen kann, nehmen die MD Indizes mit steigender Anzahl an Neurofibromen weder kontinuierlich zu noch ab, sondern weisen sehr unterschiedliche Werte auf. Würden die Werte eine gewisse Linearität aufweisen, so könnte auf eine extrem lange Reparaturzeit bzw. ein Defekt eines Zellzykluskontrollpunktes geschlossen werden.

- Mikronukleus-Test

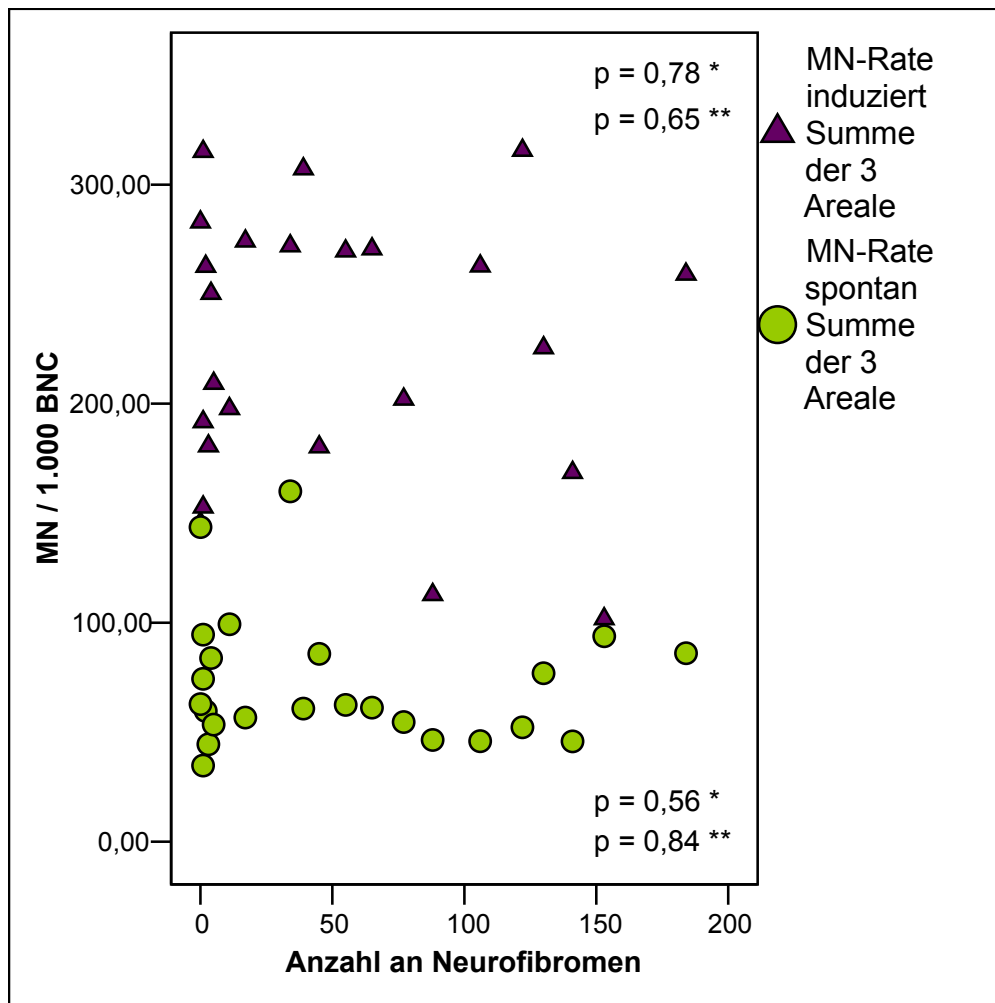


Abbildung 3.30: Verteilung der MN-Rate in Verbindung mit der Anzahl an Neurofibromen in Form eines Scatterplots.

* Spearman'sche Korrelationskoeffizient: -0,06 bzw. -0,13

** Partieller Korrelationskoeffizient nach Spearman adjustiert für Alter: 0,10 bzw. -0,05

Wie man der obigen Abbildung entnehmen kann korreliert die Anzahl der Neurofibrome nicht mit der Anzahl an Mikrokernen. Auch hier kann man eine große Variabilität der Werte unabhängig der auftretenden Neurofibrome erkennen. Es konnte in diesem Zusammenhang kein signifikanter Unterschied der DNA-Reparaturkapazität verschieden stark betroffener NF1 Patienten festgestellt werden.

3.6.3 Korrelation der Ergebnisse mit dem Alter

Es ist bekannt, dass die Symptome der NF1, vor allem die Anzahl der Neurofibrome, mit ansteigendem Alter zunehmen. In der folgenden Abbildung soll dieser Zusammenhang graphisch dargestellt werden.

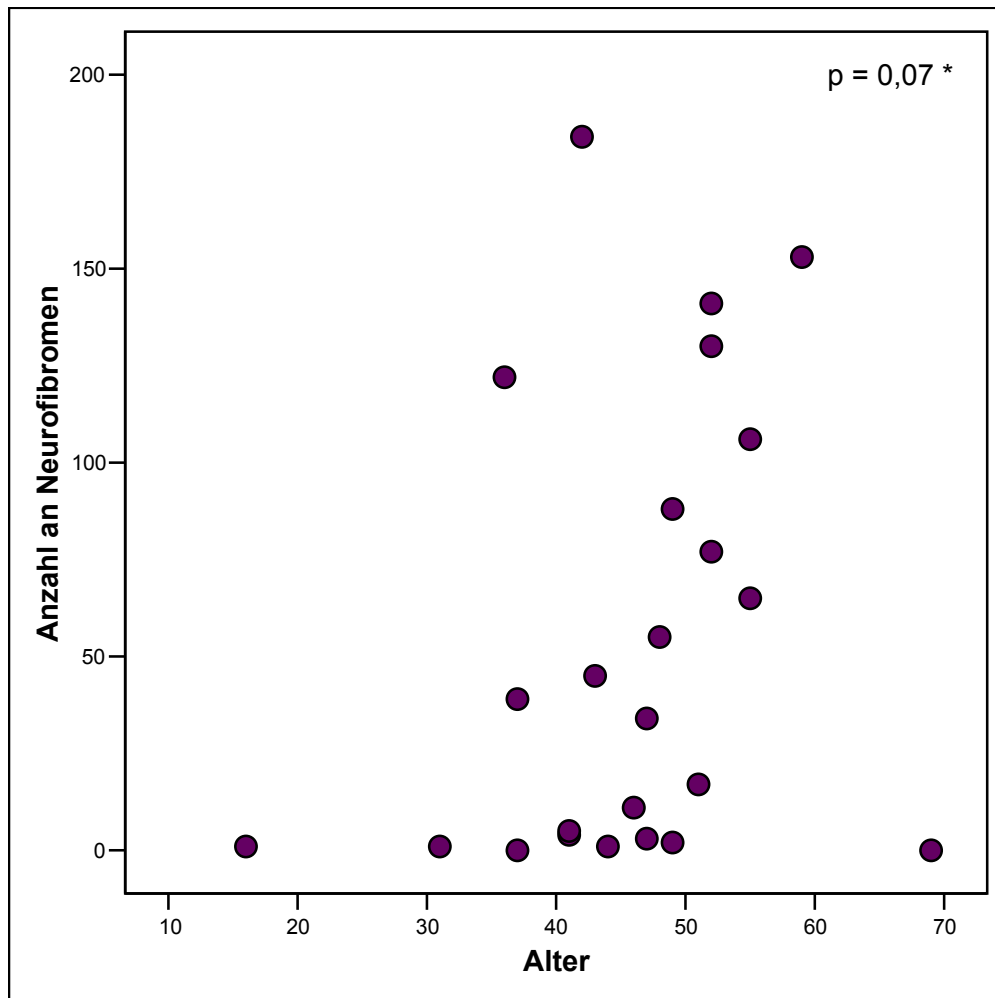


Abbildung 3.31: Dargestellt ist der Zusammenhang des Alters und der Anzahl an Neurofibromen in Form eines Scatterplots.

* Spearman'scher Korrelationskoeffizient: 0,37

Wie man der Abbildung 3.31 entnehmen kann, besteht zwischen der Anzahl an Neurofibromen und dem Alter der entsprechenden Patienten keine signifikante Korrelation. Eine tendenzielle Zunahme der Neurofibrome mit dem Alter ist dennoch zu erkennen. Da sich die Probanden in Ihrem Alter nicht extrem unterscheiden, wäre ein möglicher Anstieg der Neurofibrome in jüngeren Jahren denkbar.

4 Diskussion

Zentrale Aufgabe der vorliegenden Diplomarbeit war die Untersuchung der interindividuellen DNA-Reparaturkapazität verschiedener NF1-Patienten. Die DNA-Reparaturkapazität wurde dabei mit Hilfe verschiedener Reparaturtests ermittelt. Bei den untersuchten Probanden handelte es sich um verschieden stark betroffene NF1-Patienten, die sich aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an auftretenden Neurofibrome in zwei Gruppen – mit vielen bzw. wenigen Neurofibromen – einteilen ließen. Die Gründe der stark variablen Ausprägung der NF1 sind bisher unklar. Es gibt zahlreiche konstitutive Mutationen von denen bis auf Ausnahme der Deletion des gesamten NF1 Gens, welche zu einer starken Ausprägung der Symptome führt, nicht auf den Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten geschlossen werden kann. Es besteht daher keine Genotyp/Phänotyp Korrelation.

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass Mutationen in DNA-Reparaturgenen in Zusammenhang mit einer erhöhten Mutagensensitivität stehen und dies ein erhöhtes Krebsrisiko darstellt.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Zusammenhang zwischen der Normvarianz der Reparaturgenene und somit der interindividuellen Reparaturkapazität mit der unterschiedlichen Anzahl sich entwickelnder Neurofibrome zu überprüfen.

Die Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität erfolgte mit Hilfe des Schwesterchromatidaustausch-Tests, des Mitotic Delay-Tests und des Mikronukleus-Tests an Lymphozytenkulturen, sowie des Comet Assays an Fibroblastenkulturen.

Es konnten mit keinem der erwähnten Reparaturtests signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der interindividuellen Reparaturkapazität nachgewiesen werden. Des Weiteren bestand keine Korrelation zwischen der gemessenen DNA-Reparaturkapazität und der jeweiligen Anzahl an Neurofibromen.

4.1 Untersuchung an Fibroblastenkulturen

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Durchführung der Reparaturtests unter Verwendung von Fibroblastenkulturen geplant. Dies erwies sich jedoch aufgrund der sehr geringen Teilungsrate dieser Zellen als sehr schwierig, da bis auf den Comet Assay alle Tests proliferationsabhängig waren. Aus diesem Grund wurden die proliferationsabhängigen Tests nach mehreren Etablierungsversuchen an Lymphozytenkulturen aus peripherem Vollblut durchgeführt.

Der an den Fibroblasten durchgeführte Comet Assay zeigte nach Bestrahlung und anschließender Reparaturzeit von 30 min nicht die geringsten Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlich stark betroffenen Gruppen auf. Der nach diesem Zeitraum gemessene DNA-Schaden war bei beiden Gruppen identisch und erreichte beinahe den Wert einer unbehandelten Kontrolle. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit dieser Versuch – unter Verwendung von Fibroblastenkulturen – zur Untersuchung unterschiedlicher DNA-Reparaturkapazitäten geeignet ist. Der Comet Assay erfasst alleine die Kinetik der DNA-Reparatur, sodass genauere Aussagen über deren Qualität nicht getroffen werden können. Durch Verwendung des Comet Assay mit neutralem pH-Wert, wodurch ausschließlich DNA-Doppelstrangbrüche analysiert werden, könnten diese Ergebnisse eventuell genauer dargestellt werden.

Des Weiteren wurde – wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben – ein modifizierter Mikronukleus-Test mit integriertem Proliferationsnachweis an Fibroblastenkulturen vollzogen. Durch Vergleich der daraus resultierenden Mikronukleus-Raten konnten zwischen den beiden Gruppen keinerlei Unterschiede hinsichtlich der DNA-Reparaturkapazitäten festgestellt werden.

Aufgrund des Proliferationsnachweises durch BrdU-Markierung konnte jedoch eine erhebliche Veränderung des Zellwachstums zwischen unbehandelten und induzierten Kulturen aufgezeigt werden. Durch Berechnung der Proliferationsindizes der verschiedenen Zelllinien konnte eine starke Sensitivität der Fibroblasten gegenüber ionisierender Strahlung nachgewiesen werden. Die Proliferationsindizes nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy reichten dabei von 0,32 % bis 19,42 %.

Dieser zum Teil extreme Rückgang der Teilungsrate erklärt vor allem die Komplikationen bei der Etablierung des Mikronukleus-Tests an diesen Zellen, da Mikrokerne ausschließlich aus einer sich teilenden Zelle entstehen können.

4.2 DNA-Reparaturtests an Lymphozytenkulturen

Auch durch die Ergebnisse der DNA-Reparaturtests, welche an Lymphozytenkulturen durchgeführt wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturkapazität und Anzahl der Neurofibrome bestätigt werden. Die insgesamt 38 Patienten wurden wie bereits beschrieben aufgrund Ihrer Symptome in zwei Gruppen – stark und weniger stark betroffen – eingeteilt. Signifikante Unterschiede der DNA-Reparaturkapazitäten zwischen diesen beiden Gruppen hinsichtlich Ihrer DNA-Reparaturkapazität konnten nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man nun die Mittelwerte der ausgezählten Schwesterchromatidaustausche, so weisen beide Gruppen beinahe identische Werte auf. Bei den unbehandelten Präparaten konnten dabei 6,14 SCEs pro Metaphase bei den stark Betroffenen bzw. 6,12 SCEs pro Metaphase bei den Personen mit wenigen Neurofibromen ausgezählt werden. Diese Anzahl an SCEs ist sehr gering und daher mit Werten von gesunden Kontrollpersonen durchaus vergleichbar. In einer Studie zur Untersuchung von Brustkrebs konnten bei der gesunden Kontrollgruppe eine durchschnittliche Anzahl von $6,6 \pm 0,6$ SCEs pro Metaphase ausgezählt werden ^[97].

Dementsprechend ähnlich fällt auch der Vergleich bei den durch ionisierende Strahlung induzierten Präparaten aus. Die durchschnittliche Anzahl von 12,96 SCEs pro Metaphase bei Patienten mit vielen Neurofibromen unterscheidet sich nicht signifikant von den Patienten mit wenigen Neurofibromen, welche durchschnittlich 12,37 SCEs pro Metaphase aufweisen.

Eine steigende Anzahl an SCEs wurde mit zunehmendem Alter erwartet ^[98]. Ein linearer Anstieg konnte nicht nachgewiesen werden, dennoch war ein tendenzieller Anstieg der SCEs mit zunehmendem Alter zu erkennen. Interessanterweise konnte bei den induzierten Präparaten der Minimal- bzw. Maximalwert dem Jüngsten bzw. Ältesten Proband zugeschrieben werden, wobei die restlichen Probanden mehr oder

weniger Durchschnittswerte aufzeigten. Sowohl Minimal- als auch Maximalwert konnten als Extremwert bzw. Ausreißer angesehen werden (siehe Abbildung 3.25).

Die Anzahl entstehender SCEs wird von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Dabei können sowohl das Alter, als auch gewisse Lebensumstände und -gewohnheiten eine Rolle spielen. Bei Rauchern beispielsweise konnte ein linearer Anstieg der SCEs mit steigendem Zigarettenkonsum beobachtet werden. Zusätzlich konnten bei Nichtrauchern geringere Werte als bei ehemaligen Rauchern und selbstverständlich gegenwärtigen Rauchern nachgewiesen werden ^[99].

Aufgrund dieser vielen Parametern ist es schwierig, klare Aussagen über die gewonnen Ergebnisse zu treffen, da eine Berücksichtigung aller beeinflussenden Faktoren nicht möglich ist.

Auch bei den Ergebnissen des Mitotic Delay-Tests konnten weder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen noch eine Korrelation zwischen MD Indizes und der Anzahl an Neurofibromen der einzelnen Patienten festgestellt werden.

Die resultierenden MD Indizes mit Werten von 1,61 bis 4,90 sind mit Werten einer anderen Arbeitsgruppe unseres Institutes vergleichbar. Bei Untersuchungen sowohl von Brustkrebspatienten, als auch gesunden Kontrollpersonen lagen die dabei ermittelten MD Indizes zwischen 2 und 5.

Die Werte beider Gruppen weisen eine große Variation auf, wobei die beiden Ausreißer nach oben und unten jeweils der Gruppe mit wenigen Neurofibromen zuzuschreiben sind (siehe Abbildung 3.26).

Da ein Zusammenhang zwischen der Variabilität der NF1 und der interindividuellen DNA-Reparaturkapazität vermutet wurde, wurde bei den stark betroffenen Patienten ein sehr geringer bzw. sehr hoher MD Index erwartet, der jedoch nicht bestätigt werden konnte. Sehr hohe MD Indizes sind auf eine Beeinträchtigung der DNA-Reparaturkapazität zurückzuführen. Bevor die Zellen in die M-Phase übergehen können, werden sie in der G2-Phase repariert, wobei es dabei in Relation zur S-Phase zu einer Anhäufung der Zellen kommt. Diese Reparaturzeit nimmt mit sinkender DNA-Reparaturkapazität zu und trägt dabei zur Erhöhung der MD Indizes bei.

Bei sehr geringen MD Indizes, die aus einer verhältnismäßig geringen Anhäufung der Zellen in der S-Phase – im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen – resultieren, kann häufig auf eine fehlerhafte Zellzykluskontrolle geschlossen werden. Dabei gehen die Zellen meist mit den nicht reparierten DNA-Schäden in die Mitose über und geben

so das geschädigte Erbgut an die Tochterzellen weiter. Ein Beispiel für einen Defekt in der Zellzykluskontrolle stellt das „Nijmegen Breakage Syndrome“ dar, da bei den Zellen dieser Krankheit ein Defekt des G1/S Kontrollpunktes nachgewiesen werden kann ^[100].

Wie auch bei den beiden vorhergegangenen Tests konnten beim Mikronukleus-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die Verteilung der MN-Raten konnte in keinsten Weise mit der variablen Auswirkung der Krankheit in Zusammenhang gebracht werden.

Die durchschnittlichen induzierten MN-Raten der beiden Gruppen unterscheiden sich dabei mit Werten von 224,79 (stark betroffen) und 219,33 (weniger stark betroffen) kaum voneinander. Des Weiteren kann auch keine Korrelation zwischen den MN-Raten und der Anzahl an Neurofibromen aufgezeigt werden.

Insgesamt weisen die 38 untersuchten Patienten eine sehr unterschiedliche Sensitivität auf ionisierende Strahlung auf. Anhand dieser Ergebnisse kann nicht auf die Anzahl der Neurofibrome eines Patienten geschlossen werden. Eine geringe DNA-Reparaturkapazität kann zwar zu einem höheren Krebsrisiko in Verbindung gebracht werden, betrifft jedoch nicht die Anzahl an Neurofibromen. Bei Brustkrebspatienten konnte beispielsweise eine höhere Radiosensitivität und dadurch eine erhöhte MN-Rate im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden ^[101].

Die Ergebnisse der drei Reparaturtests sind dabei im Wesentlichen unabhängig voneinander. Das heißt, aufgrund einer extrem hohen induzierten MN-Rate kann nicht automatisch auch auf eine vergleichsweise hohe SCE-Rate bzw. einen dementsprechenden MD Index geschlossen werden.

Diese Ergebnisse decken sich in etwa mit denen einer anderen Arbeitsgruppe des Instituts, welche diese Reparaturtests bereits an einem deutlich größeren Kollektiv angewendet hat.

In der folgenden Abbildung soll die Unabhängigkeit der Testergebnisse des SCE-Tests und Mikronukleus-Tests dargestellt werden.

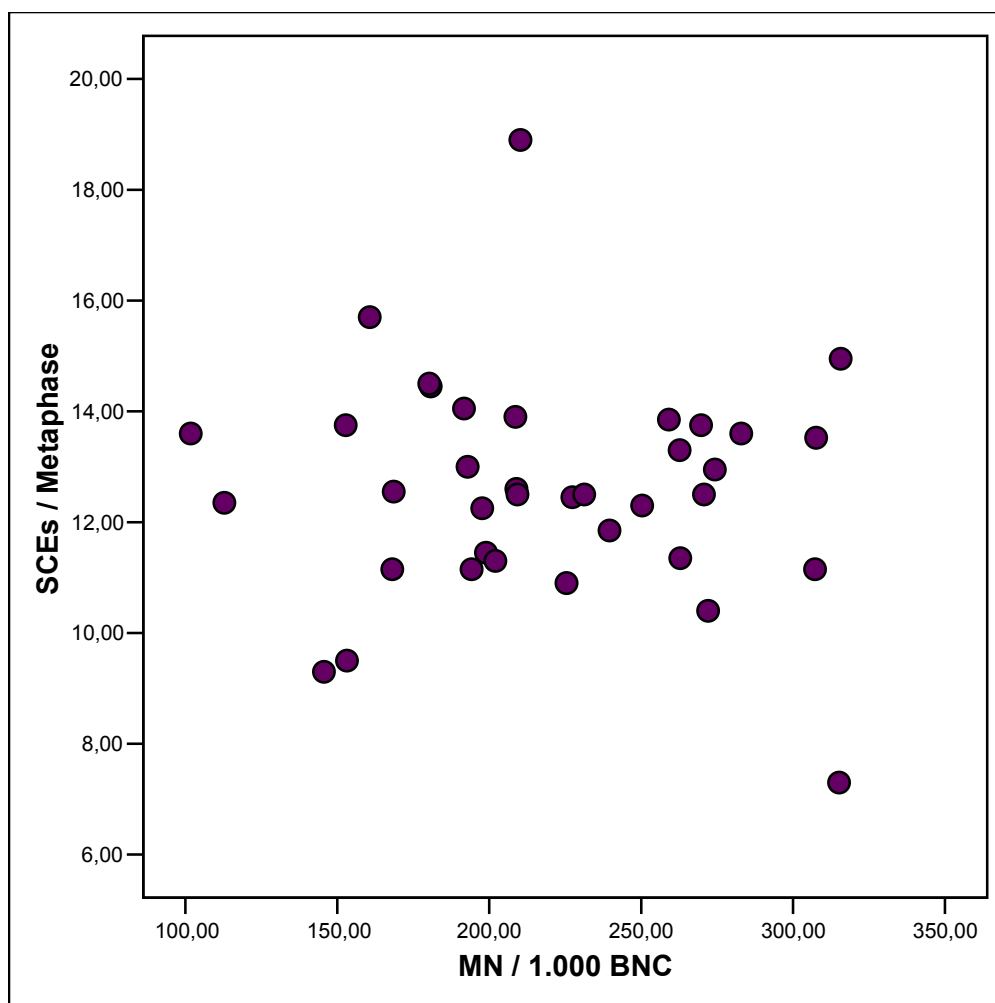


Abbildung 4.1: Scatter Plot. Dargestellt ist die Anzahl der SCEs, sowie die MN-Rate induzierter Lymphozytenkulturen. Die Ergebnisse der Tests stehen nicht in Zusammenhang zueinander.

4.3 Variabilität der NF1

Das Krankheitsbild der NF1 ist sehr variabel und unterscheidet sich vor allem in der Anzahl an sich entwickelnder Neurofibrome. Diese unterschiedliche Anzahl an Neurofibromen reicht von ein paar wenigen bis zu mehreren Hundert.

Es ist bekannt, jedoch nicht vollständig aufgeklärt, dass Patienten mit NF1 Mikrodeletionen oft bereits in frühem Alter zahlreiche Neurofibrome ausbilden. Auch bei anderen Patienten, bei denen die NF1 stark ausgeprägt ist sind die Gründe dafür ungeklärt ^[102;103].

Es stellt sich nun die Frage, welche Faktoren zur Entstehung von Neurofibromen beitragen und somit eine wichtige Rolle bei der variablen Ausprägung der Krankheit spielen.

Neurofibrome setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen und sind somit als Verbund von Zellen anzusehen. Zusätzlich zu den Schwannzellen bestehen Neurofibrome aus Fibroblasten, perineurialen Zellen, Lymphozyten und Mastzellen, wobei die erwähnten Schwannzellen den Hauptteil eines Neurofibroms ausmachen ^[7].

Grundsätzliche Voraussetzung ist eine zweite Mutation in einer Schwannzelle, welche zur Inaktivierung des NF1 Gens führt. Bei dieser inaktivierenden Mutation kann bereits zwischen zwei Arten unterschieden werden, die wiederum auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sind. Sowohl der Heterozygotieverlust aufgrund Rekombinationsprozessen und Deletionen, als auch Punktmutationen und Insertionen können zu der Bildung einer NF1^{-/-} Schwannzelle führen. Diese somatischen Mutationen könnten aufgrund der Beeinflussung der Reparaturkapazität durch verschiedenste Faktoren hervorgerufen werden.

Das NF1 Gen konnte bereits als geeignetes Ziel für Mutationen in einer Zelle mit einem Defizit der Mismatch Reparaturgene angesehen werden. Bei Patienten mit homozygoten Mutationen der Mismatch Reparaturgene, beispielsweise MLH1 und MSH2 konnten typische Symptome der NF1 diagnostiziert werden. Des Weiteren konnten Veränderungen des NF1 Gens in primären Tumoren, welche Defizite in der Mismatch Reparatur aufwiesen, bei Patienten ohne NF1 Mutation nachgewiesen werden ^[104]. Ein Reparaturdefekt erhöht die Häufigkeit von somatischen Mutationen in beiden NF1-Allelen einer Zelle, wodurch es zur Entstehung von Neurofibromen kommen kann.

In Anbetracht der Tatsache, dass solch massive Mutationen der Mismatch Reparaturgene zu einem NF1 ähnlichen Krankheitsbild führen können, wäre es durchaus denkbar, dass auch Unterschiede bei der Entstehung der somatischen Mutationen auf Defizite der DNA-Reparatur zurückzuführen sind.

Die körpereigene DNA-Reparaturkapazität, aufgrund genetischer Variationen konnte bereits in mehreren Studien mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht werden ^[105].

Wie bereits erwähnt, entstehen Neurofibrome durch die Inaktivierung der einzig verbleibenden Wildtypkopie des NF1 Gens in einer einzelnen Schwannzelle. Diese Veränderungen in der Schwannzelle reichen jedoch nicht aus, um die Bildung eines Neurofibroms hervorzurufen. Für die mögliche Tumorentstehung ist daher – zusätzlich zu den NF1^{-/-} Schwannzellen – das Vorhandensein von NF1^{+/-} Zellen im Umfeld, wie beispielsweise den Mastzellen oder Fibroblasten unabdingbar.

So reicht beispielsweise eine NF1^{-/-} Schwannzelle in einem Umfeld von NF1^{+/+} Zellen nicht aus, um die Entstehung eines Tumors zu initiieren.

Die Entstehung eines Neurofibroms in Form einer starken Gewebswucherung ist auf eine Interaktion verschiedener Zelltypen – NF1^{-/-} Schwannzellen und heterozygoten Zellen in der Umgebung – angewiesen ^[106]. Diese NF1 haploinsuffiziente Umgebung steht in Zusammenhang mit erhöhter Angiogenese, welche die Bildung von Neurofibromen fördern könnte ^[107]. Bei der Entstehung eines Tumors bei NF1 Patienten sind demzufolge mehrer Faktoren beteiligt.

Demnach müssten Patienten mit einer weniger effektiven DNA-Reparaturkapazität eine deutlich höhere Anzahl an Neurofibromen aufweisen.

Mit den hier angewendeten Tests konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen der interindividuellen DNA-Reparaturkapazität und der Entstehung von Neurofibromen und somit der variablen Expressivität der NF1 festgestellt werden.

Die zur Verfügung stehenden Daten, sowie die Kriterien nach denen die Patienten in zwei verschieden stark betroffene Gruppen eingeteilt wurden, basierten auf der Auszählung vorhandener Neurofibrome. Tumoren, die zu diesem Zeitpunkt bereits durch eine inaktivierende somatische Mutation angelegt waren, sich jedoch noch nicht manifestiert hatten, konnten demzufolge nicht berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass die Anzahl der vorhandenen Neurofibrome eines Patienten mit dem Alter zunimmt. Die Anzahl der ausgezählten Tumoren gibt daher keine Auskunft über die vorhandenen

Tumoranlagen bzw. über die individuelle Mutationshäufigkeit, welche aus der Anzahl an auftretenden LOHs und somatischen Mutationen resultiert.

Im folgenden Bild ist die starke Variabilität der NF1 zwischen einem Vater und seinem Sohn dargestellt. An diesem Bild ist die steigende Anzahl an Neurofibromen mit zunehmendem Alter deutlich zu erkennen.



Abbildung 4.2: Aufnahme des Rückens von Vater und Sohn. Dargestellt ist die unterschiedliche Expressivität der NF1. Der Vater weist im Vergleich zu seinem Sohn eine extrem hohe Anzahl an Neurofibromen auf.

4.4 Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Hilfe der durchgeführten Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich stark betroffenen NF1 Patienten hinsichtlich ihrer DNA-Reparaturkapazität festgestellt werden konnten.

Dabei war bei keinem der drei DNA-Reparaturtests eine Korrelation der Ergebnisse mit der individuellen Anzahl an Neurofibrome zu erkennen. Auch nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen – je nach Expressivität der NF1 – konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Demzufolge konnte in diesem Ansatz ein Zusammenhang der variablen Expressivität der NF1 mit der interindividuellen DNA-Reparaturkapazität nicht bestätigt werden.

Um diesen Zusammenhang dennoch aufzuklären, müssten eventuell andere, sensitivere Methoden zur Untersuchung der DNA-Reparatur zum Einsatz kommen.

Des Weiteren könnten detaillierte Informationen der Patienten bezüglich der gesamten Anzahl an Neurofibromen genauere Auskunft auf die Ausprägung der Krankheit geben.

5 Literaturverzeichnis

- [1] F.D.von Recklinghausen. Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen, Hirschwald, Berlin, (1882).
- [2] S.A.Preiser, C.B.Davenport. Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease) and its inheritance, Am J Med Sci, 156, (1918) 507-510.
- [3] S.M.Huson. Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis, Arch Dis.Child, 64, (1989) 745-749.
- [4] D.H.Gutmann, A.Aylsworth, J.C.Carey, B.Korf, J.Marks, R.E.Pyeritz, A.Rubenstein, D.Viskochil. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2, JAMA, 278, (1997) 51-57.
- [5] V.M.Riccardi, J.E.Eichner. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis, 2nd edition Johns Hopkins University Press, Baltimore, MA, (1992).
- [6] Neurofibromatosis. Conference Statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference, Arch Neurol, 45, (1988) 575-578.
- [7] J.Peltonen, S.Jaakkola, M.Lebwohl, S.Renvall, L.Risteli, I.Virtanen, J.Uitto. Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis, Lab Invest, 59, (1988) 760-771.
- [8] D.F.Easton, M.A.Ponder, S.M.Huson, B.A.Ponder. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes, Am J Hum.Genet., 53, (1993) 305-313.
- [9] S.M.Huson, P.S.Harper, D.A.Compston. Von Recklinghausen neurofibromatosis. A clinical and population study in south-east Wales, Brain, 111 (Pt 6), (1988) 1355-1381.
- [10] M.Poyhonen, S.Niemela, R.Herva. Risk of malignancy and death in neurofibromatosis, Arch Pathol.Lab Med, 121, (1997) 139-143.
- [11] R.E.Ferner, D.H.Gutmann. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis, Cancer Res., 62, (2002) 1573-1577.

- [12] J.M.Friedmann, P.H.Birch. Type 1 neurofibromatosis: A descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients, *American Journal of Medical Genetics*, 70, (1997) 138-143.
- [13] F.W.Crowe, W.J.Schull, V.Neel. A Clinical, Pathological and Genetic Study of Multiple Neurofibromatosis, Charles C Thomas, Springfield, IL., (1956).
- [14] B.R.Seizinger, G.A.Rouleau, A.H.Lane, G.Farmer, L.J.Ozelius, J.L.Haines, D.M.Parry, B.R.Korf, M.A.Pericak-Vance, A.G.Faryniarz, . Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17, *Genomics*, 1, (1987) 346-348.
- [15] J.W.Fountain, M.R.Wallace, M.A.Bruce, B.R.Seizinger, A.G.Menon, J.F.Gusella, V.V.Michels, M.A.Schmidt, G.W.Dewald, F.S.Collins. Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis, *Science*, 244, (1989) 1085-1087.
- [16] D.Viskochil, A.M.Buchberg, G.Xu, R.M.Cawthon, J.Stevens, R.K.Wolff, M.Culver, J.C.Carey, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, . Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus, *Cell*, 62, (1990) 187-192.
- [17] R.M.Cawthon, R.Weiss, G.F.Xu, D.Viskochil, M.Culver, J.Stevens, M.Robertson, D.Dunn, R.Gesteland, P.O'Connell, . A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations, *Cell*, 62, (1990) 193-201.
- [18] M.R.Wallace, D.A.Marchuk, L.B.Andersen, R.Letcher, H.M.Odeh, A.M.Saulino, J.W.Fountain, A.Brereton, J.Nicholson, A.L.Mitchell, . Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients, *Science*, 249, (1990) 181-186.
- [19] D.A.Marchuk, A.M.Saulino, R.Tavakkol, M.Swaroop, M.R.Wallace, L.B.Andersen, A.L.Mitchell, D.H.Gutmann, M.Boguski, F.S.Collins. cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product, *Genomics*, 11, (1991) 931-940.
- [20] D.H.Gutmann, D.L.Wood, F.S.Collins. Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, 88, (1991) 9658-9662.
- [21] G.F.Xu, P.O'Connell, D.Viskochil, R.Cawthon, M.Robertson, M.Culver, D.Dunn, J.Stevens, R.Gesteland, R.White, . The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP, *Cell*, 62, (1990) 599-608.
- [22] A.M.Buchberg, L.S.Cleveland, N.A.Jenkins, N.G.Copeland. Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway, *Nature*, 347, (1990) 291-294.
- [23] R.Ballester, D.Marchuk, M.Boguski, A.Saulino, R.Letcher, M.Wigler, F.Collins. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins, *Cell*, 63, (1990) 851-859.

-
- [24] G.A.Martin, D.Viskochil, G.Bollag, P.C.McCabe, W.J.Crosier, H.Haubruck, L.Conroy, R.Clark, P.O'Connell, R.M.Cawthon, . The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21, *Cell*, 63, (1990) 843-849.
- [25] G.F.Xu, B.Lin, K.Tanaka, D.Dunn, D.Wood, R.Gesteland, R.White, R.Weiss, F.Tamanoi. The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*, *Cell*, 63, (1990) 835-841.
- [26] T.N.Basu, D.H.Gutmann, J.A.Fletcher, T.W.Glover, F.S.Collins, J.Downward. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients, *Nature*, 356, (1992) 713-715.
- [27] J.E.DeClue, A.G.Papageorge, J.A.Fletcher, S.R.Diehl, N.Ratner, W.C.Vass, D.R.Lowy. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis, *Cell*, 69, (1992) 265-273.
- [28] A.Guha, N.Lau, I.Huvar, D.Gutmann, J.Provias, T.Pawson, G.Boss. Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors, *Oncogene*, 12, (1996) 507-513.
- [29] S.L.Thomas, G.D.Deadwyler, J.Tang, E.B.Stubbs, Jr., D.Muir, K.K.Hiatt, D.W.Clapp, G.H.De Vries. Reconstitution of the NF1 GAP-related domain in NF1-deficient human Schwann cells, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 348, (2006) 971-980.
- [30] L.Messiaen, K.Wimmer. NF1 Mutational Spectrum, Kaufmann D (ed): *Neurofibromatoses.Monogr Hum Genet*, 16, (2008) 63-77.
- [31] M.Upadhyaya, D.N.Cooper. *Neurofibromatosis type 1 from genotype to phenotype*, Oxford: BIOS Scientific, (1998) 65-82.
- [32] R.Fahsold, S.Hoffmeyer, C.Mischung, C.Gille, C.Ehlers, N.Kucukceylan, M.Abel-Nour, A.Gewies, H.Peters, D.Kaufmann, A.Buske, S.Tinschert, P.Nurnberg. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain, *Am J Hum.Genet.*, 66, (2000) 790-818.
- [33] M.Upadhyaya, M.Ruggieri, J.Maynard, M.Osborn, C.Hartog, S.Mudd, M.Penttinen, I.Cordeiro, M.Ponder, B.A.Ponder, M.Krawczak, D.N.Cooper. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay, *Hum.Genet.*, 102, (1998) 591-597.
- [34] A.G.Knudson, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A*, 68, (1971) 820-823.

- [35] E.Serra, S.Puig, D.Otero, A.Gaona, H.Kruyer, E.Ars, X.Estivill, C.Lazaro. Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas, *Am J Hum Genet*, 61, (1997) 512-519.
- [36] I.Eisenbarth, K.Beyer, W.Krone, G.Assum. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1, *Am J Hum.Genet.*, 66, (2000) 393-401.
- [37] S.A.Rasmussen, J.Overman, S.A.Thomson, S.D.Colman, C.R.Abernathy, R.E.Trimpert, R.Moose, G.Virdi, K.Roux, M.Bauer, A.M.Rojiani, B.L.Maria, D.Muir, M.R.Wallace. Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1, *Genes Chromosomes.Cancer*, 28, (2000) 425-431.
- [38] E.Serra, E.Ars, A.Ravella, A.Sanchez, S.Puig, T.Rosenbaum, X.Estivill, C.Lazaro. Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations, *Hum.Genet.*, 108, (2001) 416-429.
- [39] V.Wiest, I.Eisenbarth, C.Schmegner, W.Krone, G.Assum. Somatic NF1 mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers, *Hum.Mutat.*, 22, (2003) 423-427.
- [40] O.Maertens, H.Brems, J.Vandesompele, T.De Raedt, I.Heyns, T.Rosenbaum, S.De Schepper, A.De Paepe, G.Mortier, S.Janssens, F.Speleman, E.Legius, L.Messiaen. Comprehensive NF1 screening on cultured Schwann cells from neurofibromas, *Hum.Mutat.*, 27, (2006) 1030-1040.
- [41] R.D.Wood, M.Mitchell, T.Lindahl. Human DNA repair genes, 2005, *Mutat.Res.*, 577, (2005) 275-283.
- [42] A.Sancar, L.A.Lindsey-Boltz, K.Unsal-Kacmaz, S.Linn. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu.Rev.Biochem.*, 73, (2004) 39-85.
- [43] D.C.van Gent, J.H.Hoeijmakers, R.Kanaar. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat.Rev.Genet*, 2, (2001) 196-206.
- [44] P.Karran. DNA double strand break repair in mammalian cells, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 10, (2000) 144-150.
- [45] P.A.Jeggo, M.Lobrich. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?, *Oncogene*, 26, (2007) 7717-7719.
- [46] M.Shrivastav, L.P.De Haro, J.A.Nickoloff. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice, *Cell Res.*, 18, (2008) 134-147.
- [47] P.Watson, H.T.Lynch. The tumor spectrum in HNPCC, *Anticancer Res.*, 14, (1994) 1635-1639.
- [48] H.T.Lynch, C.A.de la. Hereditary colorectal cancer, *N.Engl.J Med*, 348, (2003) 919-932.

-
- [49] C.Li, L.E.Wang, Q.Wei. DNA repair phenotype and cancer susceptibility--a mini review, *Int.J Cancer*, 124, (2009) 999-1007.
- [50] D.O.Kennedy, M.Agrawal, J.Shen, M.B.Terry, F.F.Zhang, R.T.Senie, G.Motykiewicz, R.M.Santella. DNA repair capacity of lymphoblastoid cell lines from sisters discordant for breast cancer, *J Natl.Cancer Inst.*, 97, (2005) 127-132.
- [51] R.Ralhan, J.Kaur, R.Kreienberg, L.Wiesmuller. Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases, *Cancer Lett.*, 248, (2007) 1-17.
- [52] S.A.Narod, W.D.Foulkes. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond, *Nat.Rev.Cancer*, 4, (2004) 665-676.
- [53] L.C.Riches, A.M.Lynch, N.J.Gooderham. Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks, *Mutagenesis*, 23, (2008) 331-339.
- [54] R.Scully, J.Chen, A.Plug, Y.Xiao, D.Weaver, J.Feunteun, T.Ashley, D.M.Livingston. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells, *Cell*, 88, (1997) 265-275.
- [55] J.Chen, D.P.Silver, D.Walpita, S.B.Cantor, A.F.Gazdar, G.Tomlinson, F.J.Couch, B.L.Weber, T.Ashley, D.M.Livingston, R.Scully. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells, *Mol.Cell*, 2, (1998) 317-328.
- [56] J.J.Chen, D.Silver, S.Cantor, D.M.Livingston, R.Scully. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway, *Cancer Res.*, 59, (1999) 1752s-1756s.
- [57] Q.Zhong, C.F.Chen, S.Li, Y.Chen, C.C.Wang, J.Xiao, P.L.Chen, Z.D.Sharp, W.H.Lee. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response, *Science*, 285, (1999) 747-750.
- [58] P.Kerr, A.Ashworth. New complexities for BRCA1 and BRCA2, *Curr.Biol.*, 11, (2001) R668-R676.
- [59] A.R.Venkitaraman. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, *Cell*, 108, (2002) 171-182.
- [60] M.E.Moynahan, J.W.Chiu, B.H.Koller, M.Jasin. Brca1 controls homology-directed DNA repair, *Mol.Cell*, 4, (1999) 511-518.
- [61] G.Obe, P.Pfeiffer, J.R.Savage, C.Johannes, W.Goedecke, P.Jeppesen, A.T.Natarajan, W.Martinez-Lopez, G.A.Folle, M.E.Drets. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, *Mutat.Res.*, 504, (2002) 17-36.
- [62] Q.Wang, C.Lasset, F.Desseigne, D.Frappaz, C.Bergeron, C.Navarro, E.Ruano, A.Puisieux. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children, *Cancer Res.*, 59, (1999) 294-297.

- [63] M.D.Ricciardone, T.Ozcelik, B.Cevher, H.Ozdag, M.Tuncer, A.Gurgey, O.Uzunlimoglu, H.Cetinkaya, A.Tanyeli, E.Erken, M.Ozturk. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1, *Cancer Res.*, 59, (1999) 290-293.
- [64] J.Etzler, A.Peyrl, A.Zatkova, H.U.Schildhaus, A.Ficek, S.Merkelbach-Bruse, C.P.Kratz, A.Attarbaschi, J.A.Hainfellner, S.Yao, L.Messiaen, I.Slavc, K.Wimmer. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference, *Hum.Mutat.*, 29, (2008) 299-305.
- [65] F.H.Menko, G.L.Kaspers, G.A.Meijer, K.Claes, J.M.van Hagen, J.J.Gille. A homozygous MSH6 mutation in a child with cafe-au-lait spots, oligodendroglioma and rectal cancer, *Fam.Cancer*, 3, (2004) 123-127.
- [66] J.R.Ostergaard, L.Sunde, H.Okkel. Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in MSH6, *Am J Med Genet.A*, 139A, (2005) 96-105.
- [67] M.R.Hegde, B.Chong, M.E.Blazo, L.H.Chin, P.A.Ward, M.M.Chintagumpala, J.Y.Kim, S.E.Plon, C.S.Richards. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome, *Clin.Cancer Res.*, 11, (2005) 4689-4693.
- [68] A.Puisieux. [HNPCC syndrome, microsatellite instability and NF1 gene alteration], *Bull.Cancer*, 86, (1999) 812-814.
- [69] Q.Wang, G.Montmain, E.Ruano, M.Upadhyaya, S.Dudley, R.M.Liskay, S.N.Thibodeau, A.Puisieux. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type, *Hum.Genet.*, 112, (2003) 117-123.
- [70] N.P.Singh, M.T.McCoy, R.R.Tice, E.L.Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp.Cell Res.*, 175, (1988) 184-191.
- [71] R.R.Tice, G.H.Strauss. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, 13 Suppl 1, (1995) 207-214.
- [72] G.Speit, A.Hartmann. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods Mol.Biol.*, 113, (1999) 203-212.
- [73] A.R.Collins. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol.Biotechnol.*, 26, (2004) 249-261.
- [74] S.Wolff, J.Bodycote, R.B.Painter. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S, *Mutat.Res.*, 25, (1974) 73-81.
- [75] P.Perry, S.Wolff. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, 251, (1974) 156-158.

- [76] S.Wolff, P.Perry. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of chromatid exchanges without autoradiography, *Chromosoma*, 48, (1974) 341-353.
- [77] A.V.Carrano, L.H.Thompson, P.A.Lindl, J.L.Minkler. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis, *Nature*, 271, (1978) 551-553.
- [78] R.Meschini, E.Marotta, A.Berni, S.Filippi, M.Fiore, P.Mancinelli, A.T.Natarajan, F.Palitti. DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations in CHO cells, *Mutat.Res.*, 637, (2008) 93-100.
- [79] E.Braithwaite, X.Wu, Z.Wang. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro, *Carcinogenesis*, 19, (1998) 1239-1246.
- [80] D.B.Leeper, R.F.Hagemann. Repair kinetics of radiation-induced mitotic delay, *Biopolymers*, 13, (1973) 179-185.
- [81] D.Branzei, M.Foiani. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 9, (2008) 297-308.
- [82] J.J.Hu, T.R.Smith, M.S.Miller, H.W.Mohrenweiser, A.Golden, L.D.Case. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity, *Carcinogenesis*, 22, (2001) 917-922.
- [83] J.J.Hu, T.R.Smith, M.S.Miller, K.Lohman, L.D.Case. Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk, *Environ.Mol.Mutagen.*, 39, (2002) 208-215.
- [84] J.A.Heddle. A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutat.Res.*, 18, (1973) 187-190.
- [85] W.Schmid. The micronucleus test, *Mutat.Res.*, 31, (1975) 9-15.
- [86] H.Norppa, G.C.Falck. What do human micronuclei contain?, *Mutagenesis*, 18, (2003) 221-233.
- [87] S.B.Carter. Effects of cytochalasins on mammalian cells, *Nature*, 213, (1967) 261-264.
- [88] M.Fenech, A.Morley. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios*, 43, (1985) 233-246.
- [89] M.Fenech, A.A.Morley. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutat.Res.*, 161, (1986) 193-198.
- [90] M.Fenech, A.A.Morley. Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat.Res.*, 147, (1985) 29-36.

- [91] I.Decordier, A.Papine, G.Plas, S.Roesems, L.K.Vande, J.Moreno-Palomo, E.Cemeli, D.Anderson, A.Fucic, R.Marcos, F.Soussaline, M.Kirsch-Volders. Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring, *Mutagenesis*, 24, (2009) 85-93.
- [92] B.Patino-Garcia, J.Hoegel, D.Varga, M.Hoehne, I.Michel, S.Jainta, R.Kreienberg, C.Maier, W.Vogel. Scoring variability of micronuclei in binucleated human lymphocytes in a case-control study, *Mutagenesis*, 21, (2006) 191-197.
- [93] D.Varga, T.Johannes, S.Jainta, S.Schuster, U.Schwarz-Boeger, M.Kiechle, G.B.Patino, W.Vogel. An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis, *Mutagenesis*, 19, (2004) 391-397.
- [94] F.Duffaud, T.Orsiere, P.Villani, A.L.Pelissier, F.Volot, R.Favre, A.Botta. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients, *Mutagenesis*, 12, (1997) 227-231.
- [95] T.J.Cheng, D.C.Christiani, X.Xu, J.C.Wain, J.K.Wiencke, K.T.Kelsey. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer, *Mutat.Res.*, 349, (1996) 43-50.
- [96] S.Bonassi, A.Znaor, M.Ceppi, C.Lando, W.P.Chang, N.Holland, M.Kirsch-Volders, E.Zeiger, S.Ban, R.Barale, M.P.Bigatti, C.Bolognesi, A.Cebulska-Wasilewska, E.Fabianova, A.Fucic, L.Hagmar, G.Joksic, A.Martelli, L.Migliore, E.Mirkova, M.R.Scarfi, A.Zijno, H.Norppa, M.Fenech. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis*, 28, (2007) 625-631.
- [97] C.Aristei, F.Stracci, P.Guerrieri, P.Anselmo, R.Armellini, A.Rulli, F.Barberini, P.Latini, A.R.Menghini. Frequency of sister chromatid exchanges and micronuclei monitored over time in patients with early-stage breast cancer: results of an observational study, *Cancer Genet Cytogenet.*, 192, (2009) 24-29.
- [98] C.Bolognesi, A.Abbondandolo, R.Barale, R.Casalone, L.Dalpra, M.De Ferrari, F.Degrassi, A.Forni, L.Lamberti, C.Lando, L.Migliore, P.Padovani, R.Pasquini, R.Puntoni, I.Sbrana, M.Stella, S.Bonassi. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 6, (1997) 249-256.
- [99] R.Barale, L.Chelotti, T.Davini, S.Del Ry, M.G.Andreassi, M.Ballardin, M.Bulleri, J.He, S.Baldacci, F.Di Pede, F.Gemignani, S.Landi. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle, *Environ.Mol.Mutagen.*, 31, (1998) 228-242.

- [100] A.Antoccia, M.Stumm, K.Saar, R.Ricordy, P.Maraschio, C.Tanzarella. Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines, *Int.J Radiat.Biol.*, 75, (1999) 583-591.
- [101] A.Rothfuss, P.Schutz, S.Bochum, T.Volm, E.Eberhardt, R.Kreienberg, W.Vogel, G.Speit. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families, *Cancer Res.*, 60, (2000) 390-394.
- [102] L.M.Kayes, W.Burke, V.M.Riccardi, R.Bennett, P.Ehrlich, A.Rubenstein, K.Stephens. Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients, *Am J Hum Genet*, 54, (1994) 424-436.
- [103] J.H.Tonsgard, K.K.Yelavarthi, S.Cushner, M.P.Short, V.Lindgren. Do NF1 gene deletions result in a characteristic phenotype?, *Am J Med Genet*, 73, (1997) 80-86.
- [104] Q.Wang, G.Montmain, E.Ruano, M.Upadhyaya, S.Dudley, R.M.Liskay, S.N.Thibodeau, A.Puisieux. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type, *Hum.Genet.*, 112, (2003) 117-123.
- [105] M.Berwick, P.Vineis. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review, *J Natl.Cancer Inst.*, 92, (2000) 874-897.
- [106] Y.Zhu, P.Ghosh, P.Charnay, D.K.Burns, L.F.Parada. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment, *Science*, 296, (2002) 920-922.
- [107] M.Wu, M.R.Wallace, D.Muir. Nf1 haploinsufficiency augments angiogenesis, *Oncogene*, 25, (2006) 2297-2303.

6 Appendix

Tabelle 5.1: Ergebnisse des SCE-Tests an Lymphozytenkulturen der beiden untersuchten Kollektive

Kollektiv 1		
Pat. Nr.:	SCE induziert	SCE spontan
NF 17	13,90	8,65
NF 117	18,90	7,30
NF 222		
NF 142	11,45	5,35
NF 58a	12,60	6,95
NF 84a	15,70	7,15
NF 108	12,45	8,25
NF 196	9,50	5,65
NF 163d	12,50	6,10
NF 227	13,52	5,90
NF 300_1	11,15	5,40
NF 300_2	11,85	5,05
NF 300_3	11,15	5,95
NF 301	13,00	8,85

Kollektiv 2		
Pat. Nr.:	SCE induziert	SCE spontan
NF B_1	12,30	4,40
NF B_2	11,30	5,05
NF B_3	7,30	4,25
NF B_4	13,85	5,42
NF B_5	10,40	6,10
NF B_6	12,55	5,75
NF B_7	14,45	5,50
NF B_8	12,25	6,95
NF B_9	11,15	5,80
NF B_10	14,50	5,05
NF B_11	13,75	7,95
NF B_12	13,30	6,85
NF B_13	12,50	5,60
NF B_14	12,95	6,05
NF B_15	14,95	5,75
NF B_16	11,35	6,15
NF B_17	12,50	5,75
NF B_18	13,60	5,70
NF B_19	12,35	5,05
NF B_20	9,30	6,95
NF B_21	10,90	5,80
NF B_22	14,05	7,45
NF B_23	13,60	5,30
NF B_24	13,75	5,55

Tabelle 5.2: **Ergebnisse des Mitotic Delay-Tests an Lymphozytenkulturen der beiden untersuchten Kollektive**

Kollektiv 1	
Pat. Nr.:	MD Index
NF 17	3,60
NF 117	2,41
NF 222	3,03
NF 142	2,06
NF 58a	1,86
NF 84a	2,33
NF 108	2,22
NF 196	
NF 163d	1,61
NF 227	2,95
NF 300_1	3,64
NF 300_2	2,97
NF 300_3	2,86
NF 301	3,90

Kollektiv 2	
Pat. Nr.:	MD Index
NF B_1	3,72
NF B_2	3,78
NF B_3	4,90
NF B_4	4,23
NF B_5	3,30
NF B_6	2,60
NF B_7	2,64
NF B_8	2,90
NF B_9	3,55
NF B_10	2,93
NF B_11	2,85
NF B_12	3,60
NF B_13	3,51
NF B_14	3,47
NF B_15	2,81
NF B_16	3,36
NF B_17	2,85
NF B_18	2,88
NF B_19	2,87
NF B_20	2,89
NF B_21	3,76
NF B_22	2,10
NF B_23	2,04
NF B_24	3,68

Tabelle 5.3: Ergebnisse des MNT-Tests an Lymphozytenkulturen der beiden untersuchten Kollektive

Kollektiv 1		
Pat. Nr.:	MN-Rate induziert	MN-Rate spontan
NF 17	208,62	31,82
NF 117	210,28	40,26
NF 222	309,11	19,25
NF 142	198,96	55,33
NF 58a	208,94	50,53
NF 84a	160,67	73,62
NF 108	227,35	55,51
NF 196	153,19	39,79
NF 163d	231,27	57,69
NF 227	307,58	81,98
NF 300_1	194,19	115,36
NF 300_2	239,60	129,37
NF 300_3	168,11	57,84
NF 301	192,87	45,41

Kollektiv 2		
Pat. Nr.:	MN-Rate induziert	MN-Rate spontan
NF B_1	250,33	83,86
NF B_2	202,03	54,64
NF B_3	315,16	94,52
NF B_4	259,11	86,07
NF B_5	272,05	159,98
NF B_6	168,56	45,83
NF B_7	180,73	44,50
NF B_8	197,68	99,31
NF B_9	307,21	60,81
NF B_10	180,27	85,77
NF B_11	269,72	62,48
NF B_12	262,68	59,64
NF B_13	270,67	61,19
NF B_14	274,26	56,67
NF B_15	315,68	52,23
NF B_16	262,88	45,90
NF B_17	209,28	53,47
NF B_18	282,91	143,64
NF B_19	112,82	46,44
NF B_20	145,60	62,83
NF B_21	225,46	76,92
NF B_22	191,70	34,76
NF B_23	101,75	93,82
NF B_24	152,78	74,36

7 Curriculum vitae

Name:	Friederike Vera Betz
Anschrift:	Krummen 22, 88436 Eberardzell
Tel.:	+ 49 151 177 311 42
email:	Friederike.Betz@gmail.com
Geburtsdatum und -ort:	01. August 1984 in Biberach an der Riß
Staatsangehörigkeit:	deutsch
1991 – 1995	Gebhard-Müller Grundschule, Eberhardzell
1995 – 2001	Bischof Sproll Realschule, Rißegg
2001 – 2004	Wirtschaftsgymnasium der Gebhard-Müller-Schule, Biberach an der Riß
WS 2004/2005	Studium der Biologie und Mathematik, Universität Ulm
ab SS 2005	Fortsetzung des Studiums Biologie, Universität Wien Studienzweig Anthropologie, Humangenetik
Oktober 2008 bis Mai 2009	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Ulm (Titel: Ist die variable Expressivität der Neurofibromatose Typ 1 bedingt durch interindividuelle Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität der Patienten?)
Sprachkenntnisse:	Deutsch, Englisch Grundkenntnisse in Französisch und Portugiesisch
Computerkenntnisse:	MS Office, Adobe (Photoshop, Illustrator, InDesign), SPSS