

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

Universitätsklinikum des Saarlandes

**Reparatur von DNA–Doppelstrangbrüchen in Blutlymphozyten
bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen
nach ex vivo Bestrahlung**

Implikation für die Behandlungsverträglichkeit

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2011*

Vorgelegt von Sarah Derschang, geb. am 28.07.1983 in St. Ingbert

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	- 4 -
2.	Einleitung	- 8 -
2.1	DNA-Schäden als Folge ionisierender Strahlung	- 8 -
2.2	Erkennung von DNA-Schäden	- 10 -
2.3	DSB-Reparaturmechanismen	- 11 -
2.3.1	Nicht homologe Endverknüpfung	- 11 -
2.3.2	Homologe Endverknüpfung	- 13 -
2.3.3	Single-Strand Annealing (SSA)	- 15 -
2.4	Zusammenspiel der Reparaturmechanismen	- 15 -
2.5	Genetische Syndrome aufgrund mutierter Checkpoint- und Reparaturproteine	- 16 -
2.5.1	Ataxia-Telangiectasia (AT)	- 16 -
2.5.2	Ataxia-Telangiectasia-Like-Disorder (ATLA)	- 17 -
2.5.3	Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)	- 17 -
2.5.4	Ligase 4-Syndrom	- 17 -
2.6	Die Bedeutung von γ -H2AX	- 18 -
2.7	Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	- 20 -
2.8	Kopf-Hals-Tumore	- 21 -
2.9	Indikationen für die adjuvante Radiatio/Radiochemotherapie	- 22 -
2.10	Orale Mukositis	- 23 -
3.	Material und Methoden	- 24 -
3.1.	Chemikalien	- 24 -
3.2.	Antikörper	- 24 -
3.3.	Materialien	- 24 -
3.4.	Einschlusskriterien	- 24 -
3.5.	Bestrahlung der Blutproben ex vivo mit 10, 20, 40, 100 und 500 mGy	- 26 -
3.6.	Isolierung und Aufbereitung mittels γ -H2AX -Methode	- 28 -
3.7.	Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop	- 31 -

3.8.	Reparaturquotient	- 32 -
3.9.	Beurteilung des Schweregrades der oralen Mukositis	- 32 -
3.10.	Statistische Auswertung	- 34 -
4.	Ergebnisse	- 36 -
4.1	Induzierte γ -H2AX Foci.....	- 36 -
4.2	Reparaturquotient (Reparatur von DSB).....	- 37 -
4.3	Schweregrad akuter Nebenwirkungen (Mukositis).....	- 39 -
4.4	Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis.....	- 40 -
4.4.1	Test auf Mittelwertgleichheit	- 40 -
4.4.2	Nominale Zusammenhangsanalyse	- 42 -
4.4.3	Ordinale Zusammenhangsanalyse.....	- 45 -
4.5	Analyseergebnisse für Patienten ohne Chemotherapie	- 46 -
4.5.1	Test auf Mittelwertgleichheit	- 46 -
4.5.2	Nominale Zusammenhangsanalyse	- 48 -
4.5.3	Ordinale Zusammenhangsanalyse.....	- 50 -
5.	Diskussion der Ergebnisse	- 52 -
6.	Appendix	- 58 -
7.	Literaturverzeichnis.....	- 61 -
8.	Publikationen und Danksagung.....	- 67 -

Abkürzungsverzeichnis

AT	Ataxia telangiectasia
ATLA	Ataxia-telangiectasia-like-disorder
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia rad3 related protein
CUP	Cancer of unknown primary
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch / brüche
HEJ	Homologous endjoining
NBS	Nijmegen Breakage Syndrom
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NHEJ	Non homologous endjoining
RT	Radiotherapie
RCT	Radiochemotherapie
RTOG	Radiation therapy oncology group
RQ	Reparaturquotient
SSA	Single strand annealing
WHO	World health organization
UV	Ultraviolett

1. Zusammenfassung

Einleitung:

Die klinisch-experimentelle Arbeit beschäftigt sich mit der strahlentherapeutischen Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren. Ziel der Studie ist zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der ex vivo Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Blutlymphozyten und dem Auftreten der Stärke der oralen Mukositis im Rahmen der Strahlentherapie gibt. Dabei soll geklärt werden, ob Patienten mit ungünstiger ex-vivo DSB-Reparatur ein erhöhtes Risiko haben, eine ausgeprägtere orale Mukositis zu entwickeln.

Patienten und Methoden:

Bei 31 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurden vor Beginn der therapeutischen Bestrahlung Blutproben ex vivo mit Dosen von 10 mGy; 20 mGy; 40 mGy; 100 mGy und 500 mGy bestrahlt. 15 Patienten erhielten eine RT, 16 eine RCT. Die Anzahl der DSB in den Blutlymphozyten der jeweiligen Patienten wurde anhand der γ -H2AX-Foci Methode in Blutlymphozyten nach jeweils 0,5h, 2,5h und 5h gemessen und so die Reparaturkinetik in Form des Reparaturquotienten (=Anzahl Foci pro Zelle nach 5h / Anzahl Foci pro Zelle nach 0,5h) ermittelt. Die Patienten wurden in der anschließenden therapeutischen Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60-66 Gy (Einzeldosis 2 Gy) behandelt. Dabei wurden die auftretenden Nebenwirkungen in Form von oraler Mukositis wöchentlich anhand des WHO-Scores dokumentiert. Der Reparaturquotient und der Grad der oralen Mukositis bildeten damit die Grundlage für verschiedene statistische Analysen.

Ergebnisse:

Es zeigt sich ein mittlerer Reparaturquotient über die verschiedenen Bestrahlungsdosen von 0,61 (10mGy), 0,57 (20mGy), 0,5 (40mGy), 0,42 (100mGy) und 0,47 (500mGy). Die Mukositis lässt sich wie folgt angeben: 14 Patienten zeigen eine moderate Mukositis, 17 Patienten eine ausgeprägte Mukositis (Max.-Methode); 19 Patienten weisen eine moderate Mukositis, 12 Patienten eine ausgeprägte Mukositis aus (Median-Methode).

Der vermutete Zusammenhang lässt sich statistisch signifikant am besten für die Bestrahlungsdosis 500mGy ausweisen. Der T-Test auf Mittelwertgleichheit zeigt, dass der

Reparaturquotient bei Patienten mit moderater Mukositis günstiger, bei Patienten mit ausgeprägter Mukositis ungünstiger ist [Gruppe moderate Mukositis: Mittelwert von 42,6% (Max.-Methode) und 43,7% (Median-Methode.) vs. Gruppe mit ausgeprägter Mukositis: Mittelwert von 49,5% (Max.-Methode.) und 51,1% (Median-Methode)]. In beiden Fällen ist eine statistische Signifikanz von $p=0,061$ (Max.-Methode) und $p=0,047$ (Median-Methode) gegeben. Die nominale Zusammenhangsanalyse zeigt, dass ein mittelschwacher Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis besteht. Der Kontingenzkoeffizient liegt bei 0,385 und ist mit $p=0,078$ signifikant (Max.-Methode). Er weist den Wert von 0,41 aus und ist mit $p=0,06$ signifikant (Median-Methode). Die ordinale Zusammenhangsanalyse weist auf einen positiven mittleren Zusammenhang hin: Der Korrelationskoeffizient nach Spearman liegt bei 0,272 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,138$ (Max.-Methode), bei 0,375 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,038$ (Median-Methode).

Schlussfolgerung:

Die Evaluierung der ex-vivo DSB Reparatur durch die γ -H2AX Methode in Blutlymphozyten ist möglich und erlaubt die Ermittlung eines Reparaturquotienten pro Patienten und damit eine Einstufung in die Gruppen günstiger, mittlerer und ungünstiger Reparaturquotient. Zudem lässt sich die orale Mukositis anhand des WHO Score ermitteln. Die statistischen Analysen weisen auf Zusammenhänge zwischen dem Reparaturquotienten und dem Schweregrad der auftretenden Mukositis hin. Dies muss jedoch in weiteren Studien weiter evaluiert werden, ehe abschließende Aussagen möglich sind, ob sich die aufgezeigten ex-vivo Bluttests als zuverlässiger Indikator für das Auftreten der oralen Mukositis im Verlauf der therapeutischen Bestrahlung eignen.

**Repair of DNA doublestrand breaks in blood lymphocytes
at patients with head-neck tumors after ex-vivo radiation**

Implications for medial treatment

Purpose:

This clinical and experimental study deals with the radiation treatment of head-neck tumors. It examines if there is a correlation between ex-vivo repair of DNA doublestrand breaks in blood lymphocytes and the degree of oral mucositis after in-vivo radiotherapy. The main hypothesis to be tested is that patients with less favorable ex-vivo DNA repair capacity have a higher risk to develop a more severe oral mucositis.

Material and methods:

Blood samples of 31 patients with head-neck carcinoma were irradiated with 10 mGy; 20 mGy; 40 mGy; 100 mGy and 500 mGy prior to in-vivo radiotherapy. 15 patients were treated with radiotherapy (RT), 16 patients with a combined radio- and chemotherapy (RCT). The number of DNA doublestrand breaks in blood lymphocytes was investigated with the γ -H2AX method after 0,5h, 2,5h and 5h to determine the repair kinetics by means of the repair ratio (the no. of foci per cell after 5 hours divided by the no. of foci per cell after 0,5 hours). The patients received radiotherapy with a total dose of 60-66 Gy (single dose 2 Gy). The apparent degree of oral mucositis was documented weekly using the WHO-score. For further analysis moderate mucositis (grade ≤ 2) was opposed to severe mucositis (grade ≥ 3). The repair ratio and the degree of oral mucositis formed the basis for the various statistic analyses to identify possible correlations.

Results:

Average repair ratios across the various radiation doses were 0,61 (10 mGy), 0,57 (20 mGy), 0,5 (40 mGy), 0,42 (100 mGy), and 0,47 (500 mGy). 14 patients developed a moderate mucositis and 17 patients a severe mucositis. During the observation period the median prevailing degree of mucositis was moderate in 19 patients and severe in 12 patients. Of all examined ex vivo irradiation doses, the correlation between repair capacity and oral mucositis was most significant in the 500 mGy samples. T-test for equality of the mean revealed the repair ratio is more favorable for patients with moderate mucositis, and vice versa [moderate

mucositis: 42,6% (max.-method) and 43,7% (median-method) vs. severe mucositis: 49,5% (max.-method) and 51,1% (median-method)]. Both cases are significant with $p=0,061$ (max.-method) and $p=0,047$ (median-method).

Nominal correlation analysis revealed low to medium correlation between repair ratio and mucositis: Contingency coefficient was 0,385 with $p=0,078$ (max.-method) and 0,41 with $p=0,06$ (median-method). Ordinal correlation analysis showed a positive medium correlation: Correlation coefficient after Spearman was 0,272 with $p=0,138$ (max.-method) and 0,375 with $p=0,038$ (median-method).

Conclusion:

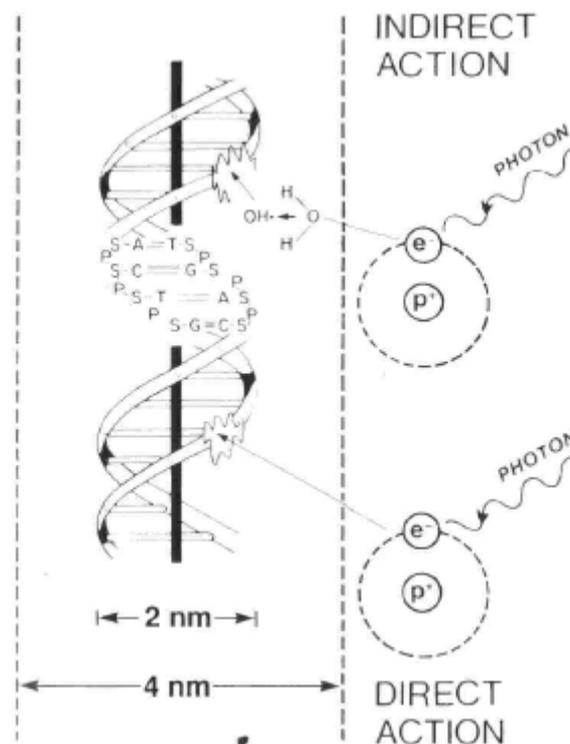
The γ -H2AX method allows investigating ex-vivo DNA doublestrand breaks in blood lymphocytes and enables to determine repair ratios for patients and separation of patients along 3 groups: Patients with more favorable, medium, less favorable repair ratios. Analysis of oral mucositis is possible via WHO-score. Statistical analyses show correlations between the repair ratio and the degree of oral mucositis. The predictive power of this approach remains to be tested in a larger study population.

2. Einleitung

2.1 DNA-Schäden als Folge ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung kann Zellen auf unterschiedliche Weise schädigen. Dabei schädigt bei der direkten Strahlenwirkung das freie Elektron selbst die DNA, während bei der indirekten Strahlenwirkung zunächst z.B. ein Wassermolekül durch das freie Elektron zum reaktiven Hydroxylradikal wird und dieses dann die DNA indirekt schädigt.

Abbildung 2.1: Direkte und indirekte Strahlenwirkung



Quelle: Hall, E. (2000): Radiobiology for the Radiologist, S.13.

In der obigen Abbildung (2.1) wird die DNA schematisch dargestellt. Dabei steht der Buchstabe A für Adenin, T für Thymin, G für Guanin, C für Cytosin sowie S für Zucker und P für Phosphat. Der direkte und indirekte Strahleneffekt erzeugen an der DNA ein komplexes Schadensmuster. Es ist anzunehmen, dass die DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) die Einzelläsion mit den weitreichendsten Folgen darstellen (Rothkamm et al., 2003).

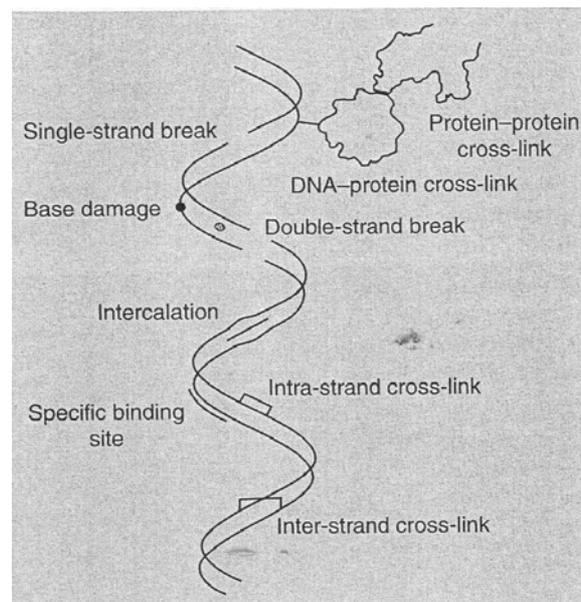
Diese Schäden sind von besonderem Interesse, da die normale Funktion der DNA von der Sequenz- und Strukturintegrität vieler Millionen Basenpaaren abhängig ist. Hier können

Schäden zu dauerhaften Veränderungen (Zelltod, Mutationen, Chromosomenaberration) und damit letztendlich auch zur Krebsentstehung führen.

Je nach Dosis und Art der Strahlung treten folgende Schäden auf:

- **Fehler der Nukleotidstruktur**: Unter Einwirkung von UV-Licht kommt es vermehrt zur Bildung von Pyrimidindimeren.
- **Isolierte Basenfehler oder Basenverlust**: Sie entstehen meist durch die Einwirkung von endogenen Noxen.
- **Einzelstrangbrüche**: Unterbrechung eines DNA-Stranges aufgrund einer chemisch modifizierten Desoxyribose oder einer gespaltenen Phosphoesterbindung.
- **Doppelstrangbrüche**: Unterbrechung beider DNA-Stränge, entweder dadurch bedingt, dass zwei Einzelstrangbrüche nahe beieinander liegen, oder wenn die DNA quer durchschlagen wird.
- **DNA-Vernetzung**: Verbindungen zwischen der DNA und einem Protein oder der beiden Doppelstränge untereinander (Cross links). Ursache hierfür sind hohe Strahlendosen.
- **Mehrfachschäden (Bulky Lesion)**: Hier treten die verschiedenen Formen der möglichen Schäden in Kombination auf. Meist handelt es sich hierbei um irreparable Schäden.

Abbildung 2.2: Übersicht über die verschiedenen Schäden



Quelle: Steel Gordon (2002): Basic Clinical Radiobiology, Abb. 8.3.

Die nachfolgende Tabelle (2.1) zeigt, welche Arten von Schäden in einer Zelle dosisabhängig auftreten. Pro 1 Gy entstehen ca. 4000 Basenschäden und 20-40 Doppelstrangbrüche. Dabei haben Untersuchungen gezeigt, dass die Anzahl der Schäden, ab denen eine Zelle ihre Apoptose einleitet, stark von der Art des Schadens abhängig ist. So liegt die Anzahl der Schäden pro Zelle bei einfachen DNA-Schäden bei ca. 10^5 - 10^6 Läsionen, während bei mehrfach geschädigten Stellen (komplexeren Schäden) weniger als 100 Läsionen ausreichen, um die Apoptose einzuleiten (Ward et al., 1987). Damit gelten DSB schon in vergleichsweise geringer Anzahl als potentiell letal für eine Zelle.

Tabelle 2.1: Arten von Schäden in einer Zelle pro 1 Gy

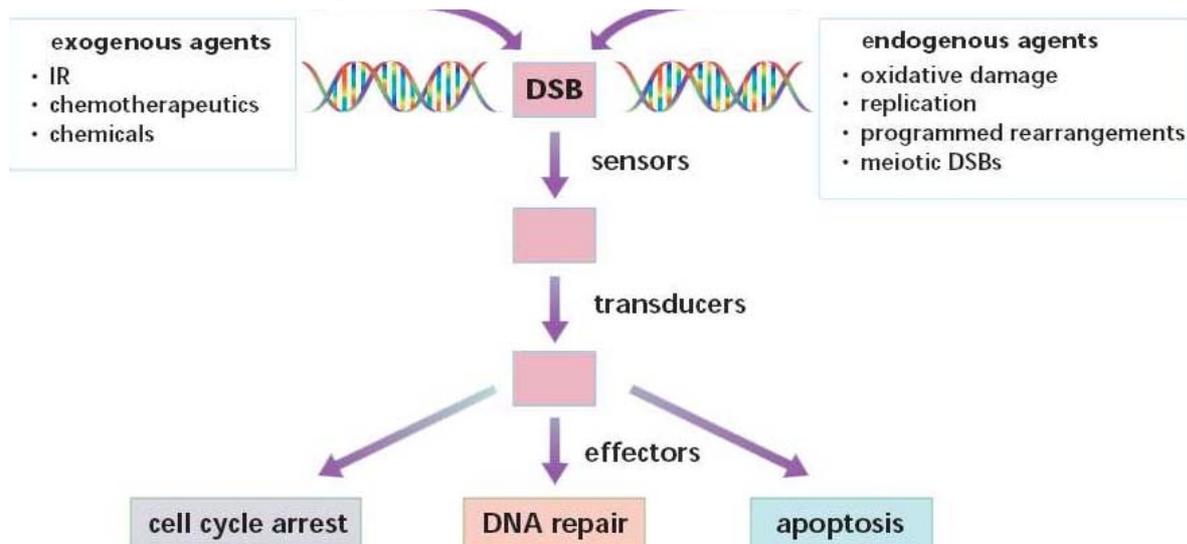
Art des Schadens	Anzahl
Basenschäden	2000-4000
Einzelstrangbrüche	1000
Gehäufte Läsionen	150-300
Doppelstrangbrüche	20-40

Quelle: Thomas Herrmann (2006): Klinische Strahlenbiologie.

2.2 Erkennung von DNA-Schäden

Entstehen Schäden an der DNA, so muss die Zelle auf diesen Schaden reagieren, um ihre genetische Integrität zu bewahren.

Abbildung 2.3: Schematische Reaktion einer Zelle auf DNA Schäden



Quelle: Khanna K., Jackson S. (2001): DNA double-strand breaks.

Wie in der Abbildung (2.3) gezeigt, können DSB durch unterschiedliche Mechanismen entstehen. Zum Einen kann die Zelle von außen geschädigt werden, zum Beispiel durch ionisierende Strahlung. Zum Anderen können auch endogene Agenzien Schäden auslösen, wie zum Beispiel oxidative Schäden. Ist ein DSB entstanden, so wird in der Zelle ein Signal, das den Schaden anzeigt, von einem Sensor erkannt. Das Signal kann dabei von dem DSB selbst ausgehen. Diesen Sensor nennt man DNA-Schadenssensor. Ist nun der Schaden erkannt, so wird eine ganze Reihe von Signal-Transduktionswegen freigeschaltet. Dabei verstärken die sog. Transducer-Proteine das Schadenssignal und leiten es an die entsprechenden Effektoren weiter. Dabei werden diese Transducer-Proteine über eine Reihe von Phosphorylierungsvorgängen aktiviert. Die entsprechend aktivierten Effektoren leiten nun entweder die Unterbrechung des Zellzyklus, die Reparatur oder sogar die Apoptose dieser Zelle ein.

2.3 DSB-Reparaturmechanismen

Nach dem Entstehen von DNA-Schäden erfolgen in der Zelle Reparaturmechanismen oder gegebenenfalls die Einleitung der Apoptose. Bei der Reparatur von DSB wird grundsätzlich zwischen der sog. nicht-homologen Endverknüpfung (non homologous endjoining, NHEJ) und der homologen Endverknüpfung (homologous endjoining, HEJ) unterschieden. Beide Mechanismen kommen bei höheren Eukaryonten vor, werden jedoch unterschiedlich eingesetzt.

2.3.1 Nicht homologe Endverknüpfung

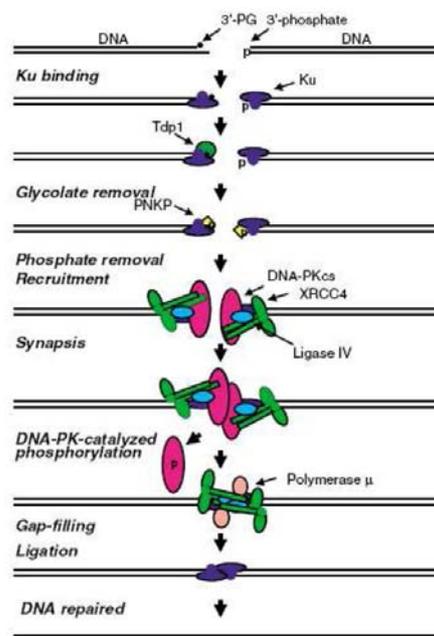
Das NHEJ findet vor allem in der G₀ und G₁-Phase statt (Lee et al., 1997; Takata et al., 1998). Durch diese Art der Reparatur können DNA-Enden wieder miteinander verbunden werden, ohne dafür homologe Sequenzen zu benötigen. Dabei spielt die DNA-abhängige Proteinkinase eine entscheidende Rolle. Sie besteht aus der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs und dem sog. Ku Protein. Hier soll kurz beschrieben werden, wie die Reparatur durch NHEJ erfolgt:

Der erste Schritt der Reparatur besteht in der Erkennung und Bindung des DSB durch das Kernprotein Ku. Ku hat dabei eine sehr hohe Bindungsaffinität für Doppelstrangenden (einem 3' oder 5' Ende) und ist unabhängig von der Sequenz. Dieses Protein besteht aus den

Untereinheiten Ku 70 (69 kDa im Menschen) und Ku 80 (83 kDa im Menschen). Beide Untereinheiten benötigt das Protein für seine Stabilität (Chen et al., 1996).

Das Protein Ku bildet dabei eine offene, ringförmige Struktur, die auf das DNA-Ende geschoben werden kann. Dabei scheint die geschlossene Seite die DNA vor einer Degradation zu schützen, während die andere Seite wohl den Zugang zur DNA ermöglicht. An diesen DNA-Komplex erfolgt die Anlagerung von der katalytischen Untereinheit DNA-Proteinkinase κ s (DNA-PKcs). Sie gehört zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3K). Diese Kinasen haben u.a. eine entscheidende Bedeutung in der Erkennung und Beseitigung von DNA-Schäden, wie beispielsweise ATM (Ataxia telangiectasia mutated) und ATR (Ataxia telangiectasia rad3 related protein) (Durocher und Jackson et al., 2001). Dieser entstandene Komplex wird als DNA-PK bezeichnet (Smith und Jackson et al., 1999). Nachdem die DNA-PKcs an die DNA gebunden hat, weist sie eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität auf. Diese Aktivierung führt sowohl zur Annäherung der DNA-Enden als auch zur Phosphorylierung weiterer Proteine, die für den weiteren Reparaturvorgang von Bedeutung sind. Ein Protein, welches so aktiviert wird, ist Artemis, das als Endonuklease überschüssige DNA-Einzelstränge entfernt (Ma et al., 2002).

Abbildung 2.4: Nicht homologe Rekombination



Quelle: Valerie, et. al. (2003).

Zuletzt wird noch ein weiterer Komplex zum Verbinden der Doppelstränge aktiviert, der sog. MRE11-Rad50-NBS1 Komplex. Dieser prozessiert die DNA-Enden sowohl durch seine Aktivität als Exonuklease und Endonuklease als auch als Helicase und stabilisiert darüber hinaus zusammen mit Ku die End-zu-End-Verbindung. (De Jager et al., 2001 ; Mc Elhinny et al., 2000; Walker et al., 2001). Ku zieht nun den XRCC4/Ligase4-Komplex an, welcher benötigt wird, um die gebrochenen Enden wieder zusammen zu fügen (Nick et al., 2000).

2.3.2 Homologe Endverknüpfung

Die homologe Endverknüpfung findet vor allem in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus statt, da dieser Reparaturmechanismus ein unbeschädigtes, homologes Chromatid oder Chromosom als Matrize benötigt. Dieser Mechanismus stellt zudem nicht nur einen Reparaturmechanismus dar, sondern ermöglicht der Zelle auch einen Austausch von genetischen Informationen zwischen den homologen Chromatiden. Eine wesentliche Rolle bei dieser Art der Reparatur spielt die sog. Rad 52- Epistasisgruppe (Thompson und Schild et al., 1999). Zu dieser Gruppe gehören: Rad50, Rad 51, Rad 52, Rad 54, Rad 55, Rad 57, Rad 59 sowie MRE11 und XRS 2 bei Hefen (Wood et al., 2001), sowie beim Menschen statt XRS 2 NBS1.

Entsteht ein DNA-Schaden, so wird dieser durch die Sensoren wie oben beschrieben detektiert. Zu diesen Sensoren zählen ATM und ATR (Abraham et al., 2001; Durocher et al., 2001). Diese beiden Sensoren phosphorylieren nun H2AX.

H2AX aktiviert nun das sogenannte Breast Cancer Tumor Suppressor Protein (BRCA1). BRCA1 reguliert dabei die Aktivität des Rad50/MRE11/NBS Komplexes, dessen Einheiten unterschiedliche Aufgaben haben:

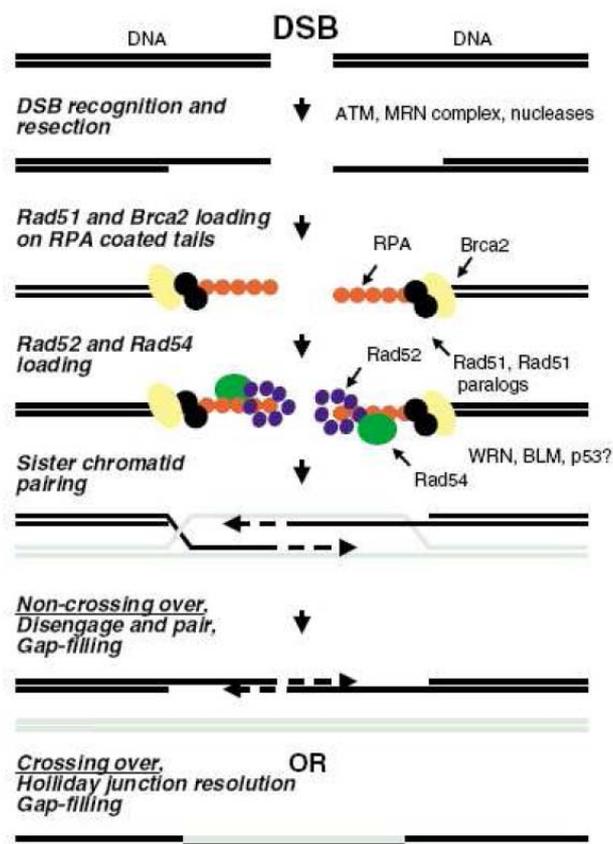
MRE11 schneidet zusammen mit einer Endonuklease die DNA aus und wandelt den Bruch in ein 3' Ende um, damit daran nun anschließend Rad51 binden kann. Nun erleichtert BRCA 2, (aktiviert durch BRCA1) die Bindung von Rad 51 auf den mit RPA bedeckten 3' Einzelstrang. Dieses trimere RPA-Protein hat eine hohe Affinität zur einzelsträngigen DNA. Es lagert sich nun an die einzelsträngige DNA an und ermöglicht nun die Suche nach der Matrizenvorlage. RPA wird anschließend, eingeleitet von Rad 52 und Rad 54, durch Rad 51 ersetzt.

Rad 52 scheint darüber hinaus den Strang vor exonukleärer Degradation zu schützen, und Rad 54 benutzt seine ATPase-Aktivität, um den DNA-Doppelstrang abzuwickeln, was die Reparatur erleichtert.

Das Nukleofilament Rad 51 besitzt für die Rekombination die besondere Fähigkeit, gebunden an die einzelsträngige DNA, die doppelsträngige DNA abzutasten und nach Homologien zu suchen. An diesem Prozess scheint neben Rad 51 auch Rad 55 und 57 beteiligt zu sein.

In einem nächsten Schritt wird nun ein Komplex gebildet aus dem 3'-Überhang der Enden und der neuen Matrizenvorlage. Auch für diesen Schritt benötigt man Rad 51. Nun muss durch eine DNA-Polymerase ein komplementärer Strang gebildet und über den Bruch synthetisiert werden. Diese Struktur wird „holiday junction“ genannt. Welche Faktoren hierfür notwendig sind ist Gegenstand von aktuellen Forschungen.

Abbildung 2.5: Homologe Rekombination



Quelle: Valerie, et. al (2003).

Im letzten Schritt muss der gebildete Komplex wieder dissoziieren, damit sich die komplementären Einzelstränge wieder zu einem intakten Doppelstrang paaren können. An diesem Schritt sind spezielle Resolvasen beteiligt.

Es gibt nun 2 verschiedene Möglichkeiten der Zusammenfügung der beiden Stränge:

- Gene conversion: Es wird nur ein kleines Stück von dem intakten zu dem geschädigten DNA- Molekül übertragen.
- Crossing over: Ein ganzer Teil des Chromosomens wird ausgetauscht.

Nun ligiert eine DNA-Ligase 1 die beiden Enden miteinander, und die Reparatur ist erfolgt. Die obige Abbildung (2.5) zeigt noch einmal schematisch die Reparatur durch die HEJ.

2.3.3 Single-Strand Annealing (SSA)

Diese Art der Reparatur stellt eine Unterform der Homologen Rekombination dar. Sie läuft beim Menschen ebenfalls über den MRE11/Rad50/NBS Komplex. Die SSA benötigt zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen zwar keine holiday junctions, aber kurze, homologe DNA Bereiche. Dabei werden die einzelnen Strangenden zunächst durch Exonukleasen abgebaut, und dann die beiden Stränge wieder zusammengefügt. Dies führt zwangsläufig natürlich zum Verlust von DNA-Sequenzen, stellt also lediglich eine Notreparatur dar. Daraus ist nun ersichtlich, dass die Länge des homologen Bereiches für die Effizienz der Reparatur von zentraler Bedeutung ist (Sugawara et al., 2000).

2.4 Zusammenspiel der Reparaturmechanismen

Natürlich lassen sich das NHEJ und das HEJ nicht komplett voneinander trennen. Die Zelle benötigt beide Arten der Reparatur zur Aufrechterhaltung ihrer genetischen Integrität. Verschiedene Studien an Hamstern haben gezeigt, dass bei einem Defekt in einem der beiden Reparaturwege die Zellen offenbar verstärkt den alternativen, intakten Weg beanspruchen (Richardson et al., 2000; Allen et al., 2002). Darüber hinaus gibt es verschiedene Faktoren, die sowohl beim NHEJ, als auch bei dem HE eine wichtige Rolle spielen. Von besonderer Bedeutung ist hier der MRE11/RAD50/NBS1-Komplex, welcher für beide Arten der Reparatur benötigt wird.

2.5 Genetische Syndrome aufgrund mutierter Checkpoint- und Reparaturproteine

Für den Menschen ist ein funktionierendes System aus Checkpointaktivierung und DNA-Reparatur von entscheidender Bedeutung. Defekte in diesem System können zu schweren gesundheitlichen Konsequenzen führen. Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, die aus Defekten in Checkpoint- oder Reparaturproteinen hervorgehen. Patienten mit solchen Syndromen haben alle einen geschädigten Reparaturmechanismus und sind daher besonders strahlensensibel. Darüber hinaus weisen sie ein erhöhtes Krebsrisiko, T-Zell-Defekte und eine chromosomale Instabilität auf. Im Folgenden werden die wichtigsten Erkrankungen aufgrund defekter Reparaturvorgänge vorgestellt.

2.5.1 Ataxia-Telangiectasia (AT)

Das autosomal-rezessive Syndrom Ataxia-Telangiectasia ist auch unter dem Namen Louis-Bar-Syndrom oder Boder-Sedgwick-Syndrom bekannt und gehört zum Formenkreis der sogenannten Phakomatosen. Dabei handelt es sich um Fehlbildungen im Bereich der Haut und des Nervensystems. Ihm liegt ein Gendefekt im sog. ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) Gen zugrunde, wobei dieses Gen auf Chromosom 11q23 lokalisiert ist. Das ATM Gen spielt, wie oben bereits erwähnt, vor allem eine Rolle beim Erkennen und Weiterleiten von DSB sowie bei der Checkpointaktivierung.

Die ersten Symptome treten meistens um das zweite bis dritte Lebensjahr auf. Diese Kinder fallen vor allem durch eine Ataxie (Gang -und Standunsicherheit) auf, welche durch eine Degeneration der Purkinje-Zellen im Kleinhirn bedingt ist. Desweiteren haben sie eine Erweiterung der kleinen Blutgefäße (Telangiektasien) vor allem in der Bindehaut des Auges, aber auch in der Gesichtshaut zur Folge. Hinzu kommen frühes Altern, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung sowie Immunschwäche und eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit. In der Bevölkerung sind 0,5-1 % heterozygote Träger der Mutation.

Heterozygote haben Mutationen in Form von verkürzten Proteinmolekülen. Bei Homozygoten können dagegen oft Rearrangierungen mit 14q11, 14q32, 7q35, 7p14, 2p11 und 22q11 auftreten. Patienten, die an ATM erkrankt sind, weisen einen Defekt im G1/S-Checkpoint und G2/M-Phase Checkpoint auf. Aufgrund der Vielfalt der Defekte wird vermutet, dass das ATM-Gen in vielen anderen Bereichen der Zelle auch wichtige Funktionen übernimmt.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die DSB-Reparatur in AT-Zellen weniger effizient abläuft (Blöcher et al., 1991) und das ca. 10% der durch ionisierende Strahlung induzierten DSB nach 24h und auch noch nach 72h unrepariert bleiben (Löbrich et al., 2000; Foray et al., 1997). Diese verringerte Reparaturfähigkeit ist u.a. für das erhöhte Leukämie- und Hodgkin-Lymphom-Risiko verantwortlich. Darüber hinaus besteht ein etwa um den Faktor 100 erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken. Die mittlere Lebenserwartung beträgt nur 20 Jahre.

2.5.2 Ataxia-Telangiectasia-Like-Disorder (ATLA)

Hierbei handelt es sich um ein seltenes Syndrom, dessen Symptome der AT ähnlich sind und das auf eine Mutation im MRE11-Gen zurückzuführen ist. Das Gen ist auf Chromosom 11q21 lokalisiert. Das MRE11-Gen bildet zusammen mit Rad50 und NBS einen für die Reparatur wichtigen Komplex. Patienten, die an ATLA erkrankt sind, leiden wie AT-Patienten an einer progressiven Degeneration des Kleinhirns (Taylor et al., 2004), weisen eine erhöhte Zahl an chromosomalen Aberrationen in Lymphozyten und eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf.

2.5.3 Nijmegen Breakage Syndrom (NBS)

Das NBS wurde zum ersten Mal 1981 beschrieben und ist eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Sie wird durch eine Veränderung im Nibrin-Gen (NBS1) bedingt (DIGWEED et al., 2004). Das NBS Protein wird direkt durch ATM phosphoryliert und bildet zusammen mit Rad50 und MRE11 einen Komplex. Charakteristisch für dieses Syndrom sind: Mikrocephalie, Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen (bereits in der Schwangerschaft), Immundefekte sowie Fehlbildungen des Gesichtes und auch des Gehirns (oft Balkenhypoplasie). Ein weiteres Charakteristikum ist auch hier das Auftreten von bösartigen Erkrankungen, wie z. B. Lymphomen bereits im Kindesalter. Die wenigsten Patienten erreichen das Erwachsenenalter.

2.5.4 Ligase 4-Syndrom

Bei diesem 1999 erstmals beschriebenen Syndrom handelt es sich um einen Defekt der DNA Ligase 4 (Riballo et al., 1999). Sie spielt eine zentrale Rolle bei der V(D) J-Rekombination. Charakteristisch sind Wachstumsverzögerung, faciale Dystrophie und Mikrocephalie. Riballo berichtete 1999 zum ersten Mal von einem Defekt der DNA Ligase IV bei einem 14-jährigen Leukämiepatienten. Dieser Patient war bis zu diesem Zeitpunkt völlig normal entwickelt und

zeigte keinerlei Immundefekte. Auffällig war damals seine starke Reaktion auf eine erfolgte Strahlentherapie. Zunächst vermutete man einen Defekt im NBS Gen, konnte diesen jedoch nicht nachweisen. Es wurden im Folgenden weitere Patienten identifiziert, die NBS-ähnliche Symptome aufwiesen, aber keinen Defekt im NBS-Gen hatten. Bei diesen Patienten konnte ein Defekt der DNA-Ligase IV nachgewiesen werden (O'Driscoll et al., 2001). Dieser Defekt geht mit einer verminderten DNA-Reparaturfähigkeit und einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit einher (Badie et al., 1997; Riballo et al., 2001; O'Driscoll et al., 2001; Rothkamm et al., 2001). Da man bei einem Defekt des DNA-Ligase 4-Gens eine stärkere Ausprägung an klinischen Pathologika erwartet hätte, konnte Riballo nun zeigen, dass es sich bei den Mutationen entweder um „Missense“-Mutationen oder um kleine Verkürzungen handelt, wobei anscheinend eine Restfunktion der Ligase erhalten bleibt (Riballo et al., 2001).

2.6 Die Bedeutung von γ -H2AX

In den vorangehenden Abschnitten wurden die verschiedenen Arten von Reparaturmechanismen und die Auswirkungen von Defekten im Reparatursystem besprochen. Nun soll gezeigt werden, wie mittels der γ -H2AX-Methode DSB nachgewiesen werden können. Dazu soll zunächst die Funktion von Histonen an sich und im besonderem die Rolle des Histons H2AX im Rahmen der Reparatur von DSB erläutert werden:

Die DNA liegt in eukaryonten Zellen in Form von Chromosomen im Zellkern vor. Dabei enthält jedes Chromosom je einen langen, kontinuierlichen DNA-Doppelstrang. Die Verpackung der DNA erfolgt mit sog. Chromatinproteinen, von denen besonders die basischen Histone von besonderer Bedeutung sind. Da die DNA durch ihre Phosphate stark negativ geladen ist, bestehen Histone aus vielen positiv geladenen Aminosäuren, wie z.B. Arginin, Lysin und Histidin. Man unterscheidet fünf verschiedene Histonklassen: H1, H2a, H2b, H3 und H4. Dabei wird der Komplex aus DNA und Histonen als Nukleosom bezeichnet. Der Nukleosomenkern (sog. „core particle“) wird dabei aus 4 Paaren der Histone H2a, H2b, H3 und H4 gebildet, um den in 1,65 Windungen 146 Basenpaare an DNA gewickelt sind. Jedes Nukleosom wird durch einen kurzen Abschnitt von sogenannter Verbindungs-DNA („linker-DNA“), die mit dem Verbindungshiston („linker-Histon“) H1 komplexiert ist, mit dem nächsten Nukleosom verknüpft (Hansen et al., 2002; Luger et al., 2003).

Histone haben eine Funktion bei der Regulation relevanter Stoffwechselfvorgänge, wie DNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur. Um definierte Stoffwechselfvorgänge zu gewährleisten, gibt es verschiedene Mechanismen, mit denen die Chromatinstruktur verändert werden kann. Dazu gehören kovalente Veränderungen der Histone, z.B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ATP abhängige Strukturveränderungen sowie der Austausch von Histonvarianten derselben Histonfamilie (Mersfelder und Parthun et al., 2006; West und Bonner et al., 1980). Ermöglicht wird dies durch das Herausragen der jeweiligen N-terminalen Enden der Histon-Oktomere.

Hier spielt die Phosphorylierung des Histons H2 eine wichtige Rolle. Dabei gibt es innerhalb dieses Histons wiederum drei verschiedene Subfamilien: H2A1, H2A2, H2AZ und H2AX. Eine wichtige kovalente Veränderung stellt die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Diese phosphorylierte Form wird als γ -H2AX bezeichnet (Rogakou et al., 1998; Sedelnikova et al.; 2002). Dabei macht H2AX ca. 10% der H2A Population aus und scheint innerhalb des Chromatins gleichmäßig verteilt zu sein (Mannironi et al., 1989).

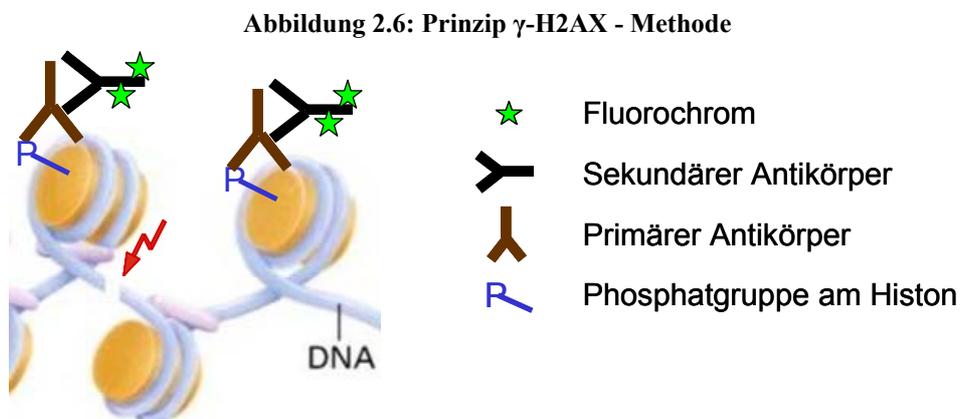
Entsteht in der DNA ein Doppelstrangbruch, so werden innerhalb kurzer Zeit (wenige Minuten), mehrere tausend H2AX- Histone zu γ -H2AX phosphoryliert (Rogakou et al., 1998; Pilch et al., 2003; Rothkamm und Löbrich et al., 2003). Dabei scheint die Phosphorylierung in unmittelbarer Umgebung des Strangbruches initiiert zu werden und sich dann bis zu einigen Megabasen Entfernung vom eigentlichen Schaden auszubreiten (Rogakou et al., 1999). Damit führt die Phosphorylierung von mehreren H2AX Megabasen um einen Doppelstrang herum zusammen mit den Reparaturproteinen und Checkpointproteinen zur Bildung nachweisbarer Foci. Das Sichtbarmachen dieser Foci wird dabei im nächsten Abschnitt genauer erklärt werden.

Die Phosphorylierungsreaktion wird dabei durch ATM, ATR und DNA-PK vermittelt. Schließlich aktiviert nun γ -H2AX verschiedene Reparaturproteine, wie z.B. Rad 50, Rad 51 und BRCA1 (Furuta et al., 2003; Hyen et al., 2004). Hier scheint nun γ -H2AX sowohl für die Rekrutierung und korrekte Anordnung dieser Reparaturkomplexe im Bereich des Schadens als auch für eine Übermittlung der Läsion an Checkpointproteine verantwortlich zu sein. Darüber hinaus wurde auch eine Funktion für die Fixierung der Bruchenden und die Lenkung der Reparatur beschrieben (Fernandez-Capetillo et al., 2004).

2.7 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Es gibt verschiedene Methoden, DNA-Doppelstrangbrüche zu identifizieren und zu quantifizieren. Zu diesen Methoden zählen der neutrale Comet Essay (Fairbairn et al., 1995), die Pulsfeld-Gelelektrophorese (Whitaker et al., 1991) oder die TUNEL Methode (Hewitson et al., 2006). Die Schwäche all dieser Methoden besteht darin, dass sie nicht sehr sensitiv bei einer geringeren Anzahl von Doppelstrangbrüchen pro Zelle sind. So gelingt zum Beispiel mittels Comet Essay der DSB-Nachweis erst ab einer Dosis von ca. 4 Gy, was einer Anzahl von ca. 160 DSB pro Zelle entspricht.

Rothkamm und Löbrich konnten 2003 zeigen, dass eine Quantifizierung der γ -H2AX Foci auch mittels Immunfluoreszenz möglich ist. Dabei können DSB durch Fluoreszenzmarkierung des Histons H2AX sichtbar gemacht werden. Dazu bindet sich ein primärer Antikörper zunächst an die freie Phosphatgruppe dieses Histons. Anschließend bindet ein sekundärer Antikörper, welcher zusätzlich mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, an den primären Antikörper und macht so den DSB sichtbar. Folgende Abbildung (2.6) soll dies verdeutlichen:



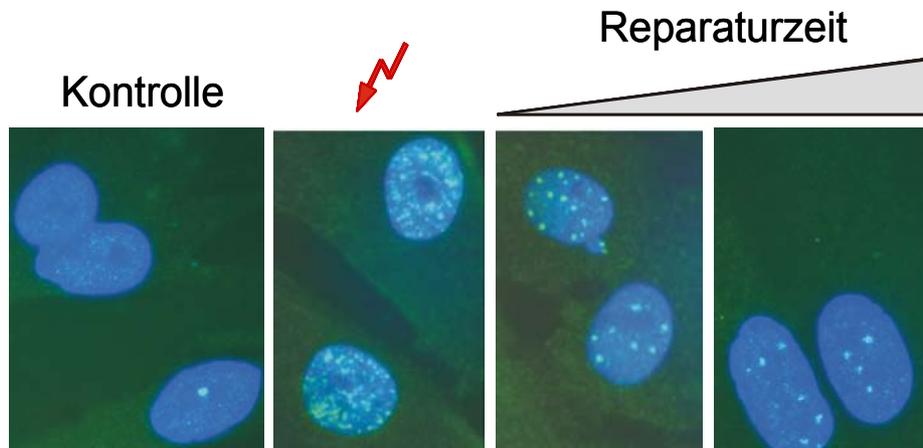
Quelle: Eigene Darstellung

Nach Bestrahlung mit ionisierender Photonenstrahlung oder Schwerionen korrelieren bei dieser Methode die darstellbaren Foci sowohl mit der Anzahl als auch mit dem Ort der erfolgten DSB (Jakob et al., 2003; Löbrich und Kiefer et al., 2006; Rothkamm und Löbrich et al., 2003).

Mit dieser Methode ist es möglich, bereits geringe Dosen von 0,1 mGy effektiv nachzuweisen (Rothkamm und Löbrich et al., 2003). Die folgende Abbildung (2.7) zeigt Blutlymphozyten, in denen mittels der beschriebenen Methode die Foci sichtbar gemacht wurden. Dabei sind

auf dem ersten Bild Zellen zu sehen, welche nicht bestrahlt wurden. Die weiteren Bilder beschreiben den Verlauf der Reparatur nach der Bestrahlung. Hier sieht man deutlich, dass die Anzahl der Foci pro Zelle mit zunehmender Reparaturzeit abnimmt.

Abbildung 2.7: Beispielhafte Darstellung der Foci in der Immunfluoreszenzmikroskopie



Quelle: Eigene Aufnahmen

2.8 Kopf-Hals-Tumore

Die bösartigen Tumore im Kopf-Hals-Bereich zählen weltweit zu den siebthäufigsten Malignomerkrankungen. Meist handelt es sich hierbei um Plattenepithelkarzinome. Man unterscheidet hierbei zwischen Karzinomen der Mundhöhle, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Hyphopharynx und des Larynx.

Verlässliche Angaben zur Gesamtzahl bösartiger Kopf-Hals-Tumore gibt es nicht. Geschätzt wird, dass in Deutschland pro Jahr etwa 50 von 100.000 Einwohnern an Krebs im Kopf-Halsbereich erkranken (Deutsche Krebsgesellschaft, 2010). Die häufigste einzelne Krebsart im Kopf-Halsbereich ist nach Angaben des Robert Koch-Instituts Kehlkopfkrebs. Jedes Jahr sind in Deutschland rund 3.400 Männer und 500 Frauen davon betroffen. Im Durchschnitt sind die Patienten zum Zeitpunkt ihrer Erkrankung 68 Jahre alt. An bösartigen Tumoren der Mundhöhle und des Rachens erkranken in Deutschland im Jahr etwa 7.900 Männer und 2.900 Frauen. Bei Männern stehen diese Tumore damit hinsichtlich der Häufigkeit an siebter Stelle aller Krebserkrankungen. Im Durchschnitt sind Männer zum Zeitpunkt der Diagnose 66 Jahre alt, Frauen 70 Jahre (Deutsche Krebsgesellschaft, 2010).

Die Stadieneinteilung dieser Tumore erfolgt anhand der TNM-Klassifikation, die im Appendix dargestellt ist. Die prognostisch günstigste Behandlungsmöglichkeit dieser Tumore

stellt nach wie vor die operative Entfernung des Tumors dar, sowie je nach Schweregrad die ein- oder beidseitige evtl. radikale Ausräumung der Halslymphknoten (radikale oder modifizierte Neck Dissection). Neben den oben genannten Kopf-Hals-Tumoren gibt es noch das sog. CUP-Syndrom (“Cancer of Unknown Primary”), worunter lymphogene oder hämatogene Metastasen eines unbekanntes Primärtumors subsummiert werden. Dies kommt bei ca. 2-5 % aller Krebspatienten vor. Bei Halslymphknotenmetastasen handelt es sich beim Primärtumor (wie sich im weiteren Krankheitsverlauf häufig herausstellt) überwiegend um einen Primärtumor in der Kopf-Hals-Region. Auch beim CUP-Syndrom besteht die Standardtherapie in der cervikalen Lymphonodektomie, die typischerweise von der adjuvanten Radio-oder Radiochemotherapie gefolgt wird (Bamberg und Molls, 2009).

2.9 Indikationen für die adjuvante Radiatio/Radiochemotherapie

Gemäß den Leitlinien des US-amerikanischen National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ist die postoperative Radiotherapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region in Abhängigkeit von der anatomischen Sub-Region ab dem Stadium pT2 pN+ cM0 oder pT>2 pN0-3 in den meisten Fällen zwingend indiziert. Die postoperative Radiochemotherapie wird bei extrakapsulärer Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen, inkompletter Tumorresektion zwingend sowie ab dem Stadium pT>2 pN2/3 optional empfohlen. Bei Patienten mit CUP-Syndrom sollte sich nach Ausräumung der Metastase eine Radiotherapie anschließen. Hier hängt die Indikation für eine Chemotherapie von der Größe und Anzahl der Metastasen ab (NCCN, 2010).

Große Studien haben gezeigt, dass Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen, die postoperativ ein hohes lokoregionäres Rezidivrisiko aufweisen, von einer simultanen Radiochemotherapie, welche auf Cisplatin basiert, profitieren. Hier zeigte sich, dass diese Therapie die lokoregionäre Kontroll- und tumorfreie Überlebensrate verbessert. Dabei wird die lokoregionäre Kontrolle um 10-20% im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie verbessert.

Keinen signifikanten Unterschied konnte man allerdings im Auftreten der Fernmetastasen, welche bei ca. 25-30% liegt, feststellen. (Fietkau et al., 2007).

Die Gesamtüberlebensrate zeigte nur in einer Studie einen signifikanten Vorteil, die anderen Studien konnten lediglich einen deutlichen Trend zugunsten der Radiochemotherapie nachweisen (Fietkau et al., 2007). Im Tumorstadium III und IV hingegen ist die Überlebensrate unter einer kombinierten Therapie mit Cisplatin signifikant höher (Bernier et

al., 2004). Je nach Studientyp gibt es dabei verschiedene Therapiekonzepte. In der deutschen Studie zum Beispiel erfolgt die Cisplatin-Gabe fraktioniert ($20\text{mg}/\text{m}^2$ über 5 Tage) und zusätzlich wird 5-FU ($600\text{ mg}/\text{m}^2$) als Dauerinfusion appliziert. Allerdings konnten Studien auch zeigen, dass die Nebenwirkungen während der simultanen Radiotherapie signifikant höher sind als bei einer alleinigen Strahlentherapie. Die Rate liegt in der EORCT-Studie bei 44% versus 21%, Bachaud 21% versus 9% und in der deutschen Studie 20,8% versus 12,6%. (Fietkau et al., 2007). Dies betrifft vor allem die Akutnebenwirkung in Form der oralen Mukositis Grad III und IV. (Fietkau et al. 2007; Elting et al., 2007; Trotti et al., 2003; Rosenthal et al., 2009). Daher muss bei diesen Patienten frühzeitig eine intensivierete supportive Therapie eingeleitet werden.

2.10 Orale Mukositis

Ziel der strahlentherapeutischen Behandlung ist die maximale Tumorzellvernichtung mit möglichst minimalen Nebenwirkungen unter Beibehaltung einer guten Lebensqualität. Natürlich ist jedoch keine Therapie ohne Nebenwirkungen, und auch bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen treten während der Bestrahlung häufig akute Nebenwirkungen in Form von akuten Schleimhautreaktionen (Mukositis) auf. Von akuten Nebenwirkungen spricht man nach RTOG-Definition von Nebenwirkungen, die innerhalb der ersten 90 Tage nach Bestrahlungsbeginn auftreten. Akute Nebenwirkungen können zu Therapieunterbrechungen und im schlimmsten Fall dazu führen, das Erreichen eines kurativen Therapieziels zu gefährden. Sie bestimmen maßgeblich die Compliance der Patienten. Hier stellt nach wie vor die orale Mukositis die stärkste Form der Akutnebenwirkungen dar. Dabei ist die Mukositis eine Konsequenz des Epithelschadens und Folge einer Reihe von komplexen molekularen und zellulären Ereignissen. Dabei wird die Pathobiologie der Mukositis nach Sonis in 5 Phasen unterteilt: Aktivierung, die erste Reaktion auf den entstandenen Schaden, Meldung des Schadens, Verstärkung, Ulzeration und Heilung. Dabei spielen oxygene Species, Bakterien, Transduction, Transkription und funktionelle Mediatoren eine wichtige Rolle in einem sehr dynamischen Prozess, in dem die epithelialen Stammzellen ein wichtiges Target darstellen. Dabei scheinen Faktoren wie der growth factor und andere non growth-Faktoren wie FGF-20, gastric peptide antrum protein und andere Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei ist Ziel der zukünftigen Therapie, diese komplexen Vorgänge genau zu verstehen und wichtige Targets auch therapeutisch einzusetzen. (Sonis, 2007).

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH , Pasching Austria
RPMI 1640 Medium w 2,0 g/l NaHCO ₃	Brochrom AG Berlin
PBS-Puffer pH 7,2- 7,4	Universitätapotheke
NS (Goat Serum)	PAA Laboratories GmbH
Methanol Rotipuran > 99,9% p.a. ACS , ISO	Carl Roth GmbH und CoKG , Karlsruhe
Aceton Ph. EUR 5.1 / USP 28 Acetonium benzolfrei	Hedinger Stuttgart

3.2. Antikörper

Primärantikörper	Anti-phosphohiston H2AX (Ser 139) Clone JBW 301 (mouse monoclonal Ig G1) JBC 1367868 Upstate Temecula
Sekundärantikörper	Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse Ig G (H + L) 2mg/ml invitrogen Molekular Probes Eugene Oregon Invitrogen A11001(56262A) USA

3.3. Materialien

NH ₄ -Heparin-Röhrchen 9ml	Sarstedt
Monovette-Kanüle Nr2	Sarstedt
Nunclon Tm delta Surface	Roskilde Dänemark
Petrischalen 145/20mm	Greiner bio-one GmbH Kremsmünster
Serologische Pipette 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt
Glass-Pasteur Pipette 150mm	VWR international
Falcons Röhre 15ml 120 mal 17mm PP	Sarstedt
Eppendorf A 4-62 Zentrifuge	
Objektträger	Roth
Fluoreszenzmikroskop E 600	Nikon

3.4. Einschlusskriterien

Für die Studie wurden Patienten mit resezierten Kopf-Hals-Karzinomen mit der Indikation zur kurativen, adjuvanten Radiotherapie mit einer Dosis von 60-66 Gy (Einzeldosis 2 Gy

3 Material und Methoden

täglich, 5 Fraktionen wöchentlich) ausgewählt. Bei zwei Patienten wurde die therapeutische Bestrahlung nicht zu Ende geführt. Diese Patienten wurden nur mit 18 und 15 Gy bestrahlt. Beginn der Erfassung dieser Patienten in die Studie war im Januar 2007 und die Erfassung endete im September 2008.

Tabelle 3.1: Übersicht über Patientencharakteristika

Patientencharakteristika und Diagnose		Alle Patienten (n=31)	Radiotherapie (n=16)	Radiochemotherapie (n=15)
Alter	Mittelwert	58	57	59
	Standardabweichung	8	8	8
	Spreizung	44-71	44-71	50-67
Geschlecht (Anzahl / in %)	Männlich	27 (87)	14 (88)	13 (87)
	Weiblich	4 (13)	2 (12)	2 (13)
Primärtumor (Anzahl / in %)	Mundhöhle	6 (19)	3 (19)	3 (20)
	Oropharynx	16 (52)	9 (56)	7 (46)
	Hypopharynx / Larynx	8 (26)	4 (25)	4 (27)
	Unbekannt (CUP)	1 (3)	0	1 (7)
Tumorstadium (Anzahl / in %)	T0	1 (3)	0	1 (6)
	T1	10 (32)	6 (37,5)	4 (27)
	T2	9 (29)	4 (25)	5 (33)
	T3	8 (26)	6 (37,5)	2 (13)
	T4	3 (10)	0	3 (20)
Lymphknoten- stadium (Anzahl / in %)	N0	7 (23)	7 (44)	0
	N1	6 (19)	4 (25)	2 (13)
	N2a	4 (13)	3 (19)	1 (6)
	N2b	10 (32)	1 (6)	9 (60)
	N2c	4 (13)	1 (6)	3(20)
	N3	0	0	0
UICC Stadium (Anzahl / in %)	Stadium I	1(3)	1(6)	0
	Stadium II	2(6)	2(12)	0
	Stadium III	9(29)	8(50)	1(6)
	Stadium IVa	19(61)	5(31)	14(93)
	Stadium IVb/c	0	0	0
Karnofsky Index (%)	100	0	0	0
	90	11 (35)	6 (37,5)	5 (33)
	80	14 (45)	5 (31)	9 (60)
	70	6 (19)	5 (31)	1 (6)

Quelle: Eigene Darstellung.

Es wurden 31 Patienten mit resezierten Kopf-Hals-Karzinomen aufgenommen. Einschlusskriterium war ein Alter zwischen 18-80 Jahren und ein Karnofsky Index von mindestens 60%. Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 58 Jahren, wobei es sich um 27 männliche und 4 weibliche Patienten handelte. Bei den Tumoren handelte es sich um Tumore der Mundhöhle (n=6 Patienten), des Oropharynx (n=16), Hypopharynx-und Larynx (n=8), und bei einer Patientin lag ein CUP-Syndrom vor. Bei 15 Patienten bestand die Indikation für eine kombinierte Radio-Chemotherapie. Da der Nodalstatus bei der Indikation der Chemotherapie eine wichtige Rolle spielt, sind diese Gruppen der Patienten RT und RCT bezüglich des Nodalstatus nicht balanciert. Außerdem ist zu erwähnen, dass bei 2 Patienten wegen der starken Nebenwirkungen die Gesamtdosis nicht gegeben werden konnte und dass bei 3 Patienten die Chemotherapie unvollständig war.

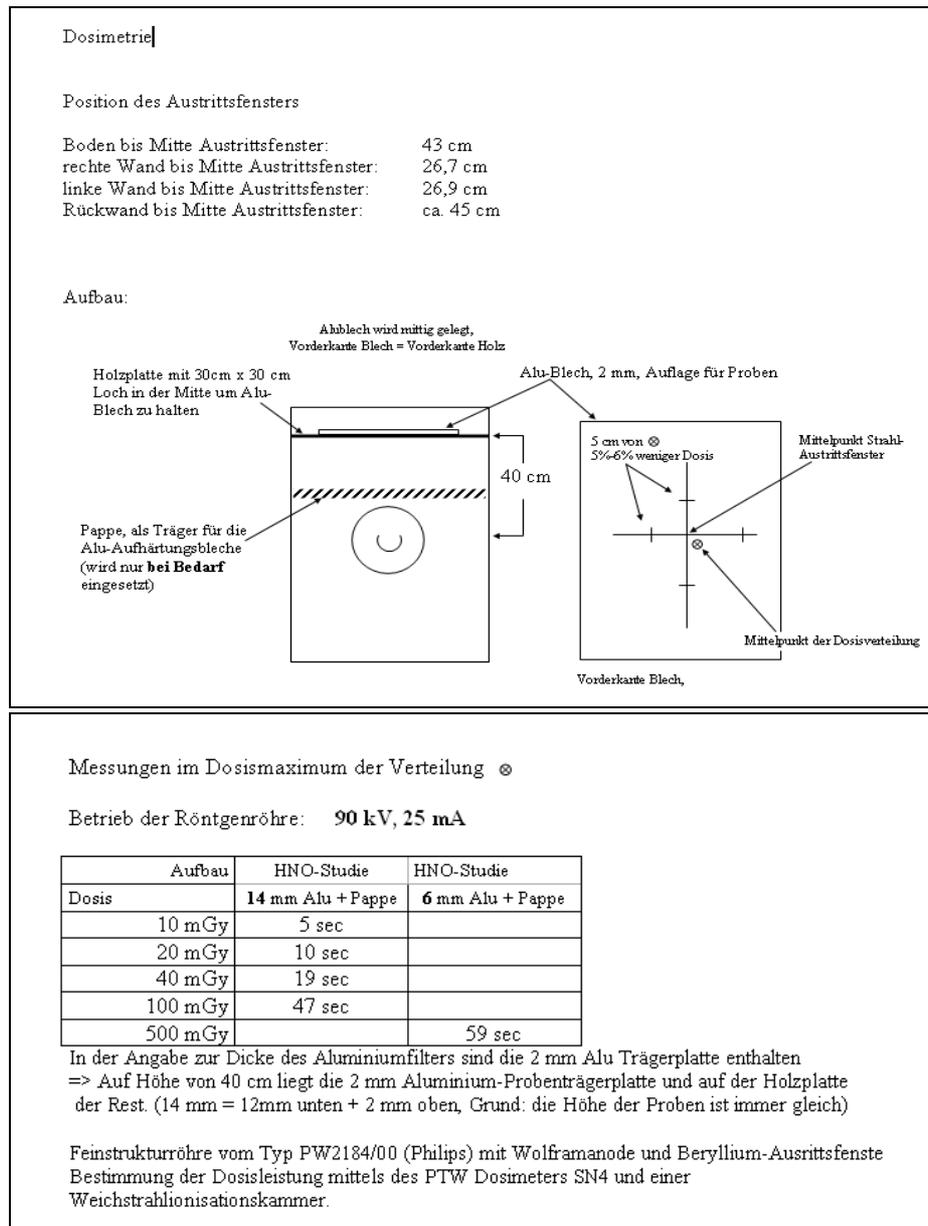
Um potentielle interindividuelle Unterschiede bezüglich des Gesamtbestrahlungsvolumens zu vermeiden, wurden bei jedem Patienten die 80%-Isodosen Linie bestimmt. Die Bestrahlungsfelder zeigten nur geringe interindividuelle Unterschiede, so dass ein Vergleich der Patienten bezüglich der Nebenwirkung in Form der oralen Mukositis möglich wurde.

Die teilnehmenden Patienten erklärten sich in der Studie zu einer Blutentnahme von ca. 72 ml Blut vor ihrer ersten Bestrahlung bereit und willigten darüber hinaus in einen wöchentlichen Kontrollbesuch zur Erhebung ihrer Nebenwirkungen (Mukositis) im Rahmen der Strahlentherapie ein.

3.5. Bestrahlung der Blutproben ex vivo mit 10, 20, 40, 100 und 500 mGy

Der Nachweis mittels γ -H2AX wurde in dieser Arbeit über die Bestimmung der DSB in Blutlymphozyten geführt. Zunächst wurde jedem Patienten vor der Erstbestrahlung 72 ml Blut entnommen. Um einen Temperaturverlust der Blutproben zu verhindern, wurde zur Blutentnahme ein Wärmegefäß mit 37 Grad Celsius warmen Wasser mitgeführt. Im Labor wurden jetzt je 3 ml Blut in je 6 ml RPMI Nährmedium (aus dem Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius) gegeben. Für jede mit einer definierten Dosis zu bestrahlende Probe wurden je 3ml heparinisiertes Vollblut entnommen. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5; 2,5 und 5 Stunden) aufbereitet. Außerdem wurden 3 verdünnte Blutproben als Kontrollproben mitgeführt, die nicht bestrahlt wurden. Zunächst wurden diese in einem Wärmegefäß in das Institut für Biophysik gebracht, um mit den unterschiedlichen Dosen von 10, 20, 40, 100 und 500 mGy bestrahlt zu werden.

Abbildung 3.1: Aufbau der Röntgenröhre



Quelle: Eigene Darstellung

3.6. Isolierung und Aufbereitung mittels γ -H2AX -Methode

Die bestrahlten Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius im Wärmeschrank inkubiert. Nach 0,5; 2,5 und 5 Stunden wurden jeweils Proben aus dem Brutschrank entnommen und als 0,5; 2,5 und 5h-Punkt aufbereitet. Die Aufbereitung der Blutproben erstreckte sich über die Dauer von 2 Tagen. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

1. Tag

1. Lymphozytentrennung

- a) Zu Beginn erfolgte die Lymphozytenisolierung. Dazu wurden Falcons mit je 6 ml Lymphozyten-Trennmedium bereits vorbereitet und kurz anzentrifugiert. Nun wurde vorsichtig, damit eine Trennschicht entstand, 6 ml Blut auf das Trennmedium aufgetragen. Im Falcon befand sich somit das Blut in der oberen, das Trennmedium in der unteren Schicht.
- b) Die Proben wurden dann für 25 Minuten bei 1200g ohne Bremse zentrifugiert.
- c) Zwischenzeitlich wurden Deckgläser in einer Petrischale ausgesetzt, mit 1%iger Gelatine bedeckt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit geschlossenem Deckel inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Gelatine abgesaugt, und die Deckgläser wurden bei geöffnetem Deckel zum Trocknen gebracht.
- d) Nach dem Zentrifugieren konnten die Lymphozyten aus dem oberen Drittel des Falcons mit einer Glasküvette und einem Ballon entnommen werden, wo sie als helle Ringstruktur sichtbar waren. Der abgenommene Zellrasen wurde nun in einen sauberen Falcon gegeben und je 5 ml PBS hinzugefügt. Danach wurde der Falcon 5mal über Kopf durchmischt.
- e) Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 300g (Programm3) zentrifugiert.
- f) Nach dem Zentrifugieren entstand am Boden ein Pellet, das nach dem Verwerfen des Überstandes kurz aufgeratscht und erneut mit 5ml PBS gewaschen und schließlich 5mal über Kopf durchmischt wurde.
- g) Nun wurden die Proben bei 200g (Programm4) für 10 Minuten zentrifugiert.
- h) Die getrockneten Deckgläser wurden dann in eine bereits vorbereitete Petrischale ausgesetzt, wobei jede Probe (Kontrolle, 10, 20, 40, 100 und 500 mGy) 2 Deckgläser erhielt.

3 Material und Methoden

- i) Im Anschluss an das Zentrifugieren wurde erneut der Überstand verworfen und das Pellet aufgerührt. Das Pellet wurde nun mit 170µl PBS gewaschen und 2mal resuspendiert.

2. Aufbringen der Lymphozyten auf die Deckgläser

- j) Nun erfolgte das Auftragen der Lymphozyten auf die Deckgläser. Hierzu wurden pro Deckglas 100 µl des Mediums aufgetragen.
- k) Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben für 6 Minuten bei Raumtemperatur.

3. Fixierung in Methanol

- l) Danach erfolgte die Fixierung mit Methanol. Dazu wurden die Deckgläser einzeln aus der Petrischale entnommen, abgetropft und für 30 Minuten in – 20 Grad Celsius kaltes Methanol inkubiert.

4. Permeabilisierung mit Aceton

- m) Nach 30 Minuten erfolgte die Permeabilisierung mit Aceton. Dazu wurden die Proben aus dem Methanol genommen, abgetropft und für 1 Minute in -20 Grad kaltes Aceton gegeben.

5. Waschen mit PBS/ 1%iges NS

- n) Die Proben wurden danach abgetropft und in 6-Well-Platten mit je 4ml PBS/1%igesNS pro Deckglas gegeben und für 10 Minuten auf dem Wippletisch bei 20 rpm gewaschen.
- o) Danach erfolgte das Absaugen des PBS/NS nach 10 Minuten und die Erneuerung von 4ml PBS/NS pro Well, und es folgte ein erneuter Waschvorgang bei 20 rpm für 10 Minuten.

6. Blocken mit Normalserum (1% in PBS)

- p) Nach Ablauf dieser 10 Minuten wurden die Proben nun geblockt. Dazu wurde das PBS/NS abgesaugt und wieder erneuert. Die Proben inkubierten nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

7. Aufbringen des Primärantikörpers

- q) Jetzt erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dazu wurden die Proben aus den 6-Well-Platten entnommen, abgetropft und in vorbereitete Petrischalen mit feuchter Kammer gegeben, wobei jeder Wert 2 Deckgläser besaß.

3 Material und Methoden

Der Primärantikörper wurde nun in einer Verdünnung mit PBS/NS von 1:800 zu je 40 µl je Deckglas aufgetragen. Der Antikörper wurde dabei vor dem Auftragen bei 13.000 rpm 1 Minute anzentrifugiert.

- r) Die Deckgläser inkubierten nun in dieser feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank

2. Tag:

Die Proben wurden vor der Weiterbearbeitung ca. 1-2 Stunden vorher aus dem Kühlschrank genommen, um bei der Aufbereitung Raumtemperatur zu haben.

1. Waschen der Deckgläser in PBS/NS

- a) Die Proben wurden aus der feuchten Kammer entnommen, abgetropft und in mit jeweils 4ml PBS/NS vorbereiteten 6-Well-Platten gegeben. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 20 rpm auf den Wippletisch gewaschen.
- b) Im Anschluss wurde das PBS/NS abgesaugt und erneuert und dann erneut für 10 Minuten gewaschen. Dieser Vorgang wiederholte sich danach noch einmal.

2. Aufbringen des Sekundärantikörpers

- c) Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Da der Antikörper lichtempfindlich ist, wurden die folgenden Schritte in einem dunkeln Raum durchgeführt. Zunächst wurde der Antikörper mit PBS/NS in einem Verhältnis von 1:400 verdünnt und 1 Minute bei 13.000 rpm herunterzentrifugiert. Die Deckgläser wurden aus den 6-Well-Platten genommen und in eine erneuerte feuchte Kammer gegeben. Jetzt wurden auf jedes Deckglas 80 µl Sekundärantikörper gegeben. Die Deckgläser inkubierten nun im Dunkel bei Raumtemperatur für 1 Stunde.

3. Waschen mit PBS

- d) Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben in PBS gewaschen. Dazu wurden die Proben aus der feuchten Kammer genommen, der Antikörper wurde ablaufen gelassen. Nun wurden die Proben in mit je 4 ml PBS gefüllten 6-Well-Platten gegeben und für 10 Minuten bei 20rpm auf dem Wippletisch gewaschen. Danach wurde PBS abgesaugt, erneuert und wieder für 10 Minuten gewaschen. Dieser Waschvorgang fand insgesamt 4 Mal statt.

4. Eindecken der Deckgläser

- e) Im Anschluss an den 40 minütigen Waschvorgang mussten die Deckgläser eingedeckt werden. Dazu wurden je 3 µl Mounting Medium und Dapi pro Objektträger vorgelegt. Die Deckgläser wurden aus dem Puffer genommen und getrocknet. Anschließend wurden sie mit der Zellseite nach unten auf das Mounting Medium aufgebracht und leicht angedrückt.
- f) Danach wurden die Proben zum Trocknen über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

5. Versiegelung der Deckgläser

- g) Am nächsten Tag erfolgte die Versiegelung der Deckgläser mit Nagellack.

3.7. Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop

Zur Focizählung der auf den Deckgläsern erhaltenen Proben wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Nikon (Typ E600) verwendet. Es wurden dabei Vergrößerungen von 60x und von 100x verwendet. Das 60er Objektiv wurde zur Einstellung der Zellen und zur Überprüfung der Färbequalität verwendet. Die Auswertung einer auf dem Deckglas befindlichen Probe wurde mit dem 100er Objektiv (Öl-Objektiv) durchgeführt. Die Auswertung einer auf dem Deckglas befindlichen Probe beinhaltete die Zählung von mindestens 100 Zellen oder 40 Foci. Dabei wurden die Zellen eines Deckglases systematisch durchgerastert, jede Zahl an DSB in einer Zelle notiert, und anschließend die Anzahl der Foci pro Zelle ermittelt. Dieses Bild ergibt sich nun beispielsweise für den Patient SC1 für 10 mGy nach 0,5 Stunden.

Tabelle 3.2: Auswertung für Patient SC1 am Beispiel 10 mGy nach 0,5 Stunden

Foci	Zellen	Summe	Foci
0	252	252	0
1	30	30	30
2	11	11	22
3	0	0	0
4 etc.	0	0	0
		Σ : 293	Σ : 52
		Foci/Zelle = 0,177	

Quelle: Eigene Darstellung

Wie aus der obigen Tabelle (3.2) hervorgeht, wurden bei 252 Zellen dieses Deckglases keine Foci gezählt, bei 30 Zellen konnte ein Focus gezählt werden und bei 11 Zellen zeigten sich 2

Foci. Dies ergab nun für diesen Zeitpunkt einen Foci pro Zelle Wert von 0,177. Dieser Wert ergibt sich aus der Division der Anzahl der Foci durch die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen. Analog zu diesem Beispiel wurden nun auch für die anderen Zeitpunkte die Anzahl der Foci pro Zelle gezählt.

3.8. Reparaturquotient

Die Definition der individuellen Kompetenz, DSB zu reparieren, basiert auf der Anzahl der ermittelten DSB in den Blutlymphozyten zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 0,5h, 2,5h und 5h), wobei auf die Quantität der DSB von den ausgezählten Foci pro Zelle geschlossen wird.

Der Reparaturquotient wird nun als Quotient aus der Anzahl der Foci pro Zelle nach 5h und 0,5h definiert:

$$\text{Reparaturquotient} = \frac{\text{Anzahl Foci pro Zelle nach 5h}}{\text{Anzahl Foci pro Zelle nach 0,5h}}$$

Dies soll an zwei Beispielen illustriert werden: aus der Blutprobe des Patienten SC1 wird 0,5h nach ex-vivo Bestrahlung mit 500mGy ein Wert von 3,47 Foci pro Zelle ermittelt (Induktion). Nach 5h zeigt sich ein Wert von 0,89 Foci pro Zelle. Damit ergibt sich ein Reparaturquotient von $0,89/3,47 = 0,256$. Dies bedeutet, dass nach 5h nur noch 26% der noch initial gemessenen Foci pro Zelle vorliegen. Dies drückt aus, da keine 1:1 Korrelation mit der DSB-Reparatur vorliegt, dass ein höherer Prozentsatz an eliminierten Foci eine günstigere DSB-Reparatur bedeutet. Ein anderer Patient SH 18 hat dagegen nach 0,5h einen Wert von 4,21 Foci pro Zelle und nach 5h noch einen Wert von 2,72 Foci pro Zelle. Dies bedeutet, dass sein Reparaturquotient bei $2,72/4,21 = 0,646$ liegt. Bei diesem Patienten sind also nach 5h noch 65% der zu Beginn auftretenden Foci pro Zelle vorhanden, womit ein unterdurchschnittlicher Reparaturquotient vorliegt.

3.9. Beurteilung des Schweregrades der oralen Mukositis

Um die Ausprägung der oralen Mukositis zu erfassen, wurden die Patienten einmal pro Woche während der Strahlentherapieserie und in den Wochen 9 und 12 im Rahmen der ambulanten Nachsorge durch speziell geschulte Untersucher nach einem vorgegebenen Erhebungsbogen evaluiert. Dieser ist im Appendix (Teil B) dargestellt.

Die Evaluation der oralen Mukositis basierte dabei auf der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und erfolgte unter standardisierten Bedingungen, so dass Mund und Oropharynx nacheinander untersucht wurden (Ober- und Unterlippe, rechte und linke Wange, rechte und linke ventrale, sowie laterale Zunge, Mundboden sowie harter und weicher Gaumen). Notiert wurden Schleimhautveränderungen in Form von Erythemen oder Ulzerationen sowie Pseudomembranen. Darüber hinaus wurden die Patienten nach zusätzlichen Aspekten, wie z.B. die Art der Nahrung, die sie zu sich nehmen können, und die vorhandenen Schmerzen, befragt. Nach dem Ausfüllen des ersten Beurteilungsbogens ergibt sich durch Übertragen der Ergebnisse auf den zweiten Erhebungsbogen der Mukositis-Score.

Abbildung 3.2: Beurteilung des Schweregrades der Mukositis mit Hilfe des WHO-Scores

WHO-Wert
0 = Keine Schäden
1 = Schmerzen/Wundsein und Erythem, kann rissige Wangenschleimhaut mit oder ohne Erythem umfassen
2 = Ulkus mit oder ohne Erythem, kann feste Nahrung zu sich nehmen
3 = Ulkus mit oder ohne Erythem, kann nur flüssige Nahrung zu sich nehmen
4 = Ulkus mit oder ohne Erythem, kann weder feste noch flüssige Nahrung zu sich nehmen

Quelle: WHO

Wichtig ist, dass diese Erhebung für jeden Patienten einmal pro Woche über einen Zeitraum von 6 Wochen durchgeführt wurde. Um den Schweregrad der Mukositis für einen Patienten nun aggregiert angegeben zu können, werden aufgrund der Ordinalskala dieses Merkmals die Maximum- und die Median Methode eingesetzt. Bei der Maximum-Methode gibt der während dieses Zeitraums maximal erreichte Wert den Schweregrad der Mukositis an. Bei der Median-Methode wird hingegen aus allen während des Beobachtungszeitraums erreichten Werten der Median, d.h. ein mittlerer Wert bestimmt. Bei einem WHO-Mukositis Score größer und gleich drei wird von einer ausgeprägten Mukositis gesprochen. Ist dieser hingegen kleiner als drei, wird sie als moderat bezeichnet. Exemplarisch zeigt die nachfolgende Tabelle die Erhebungsergebnisse für 3 ausgewählte Patienten über den betrachteten Zeitraum von 6 Wochen nach Beginn der therapeutischen Bestrahlung.

Tabelle 3.3: WHO Mukositis Score

Patient	Woche1	Woche2	Woche3	Woche4	Woche5	Woche6	WHOWert	Median-WHO
SH5	0	2	3	2	0	2	3	2
BK25	1	2	2	1	1	1	2	1
RK26	1	2	1	1	1	2	2	1

Quelle: Eigene Darstellung

Dabei können sowohl die Maximum- als auch die Medianmethode herangezogen werden. Mit der Maximum- Methode wird die Inzidenz bestimmt, d.h. sie gibt den während des Betrachtungszeitraums maximal erreichten Wert, den Schweregrad der Mukositis an. Dieser liegt für den Patienten SH5 somit bei 3. Der Nachteil dieses Ansatzes liegt jedoch darin, dass eine einmalige starke Ausprägung des WHO-Mukositis Score dazu führt, dass insgesamt die Nebenwirkungen als stark gelten, obwohl zu den anderen Erhebungszeitpunkten der Patient nur vergleichsweise schwache Nebenwirkungen zeigt. Mit der Median-Methode wird eher die Dauer der Mukositis betrachtet, d.h. es wird aus allen während des Betrachtungszeitraums erreichten Werten der Median bestimmt. Dieser liegt für den Patienten SH5 somit bei 2. Damit wird sichergestellt, dass ein einmalig hoher WHO-Mukositis Score nicht zu der oben aufgezeigten Verzerrung der auftretenden Nebenwirkungen führt und somit eine bessere Abbildung dieser erfolgt. Für beide Erhebungsmethoden (Maximum- und Medianmethode) erfolgt die Unterteilung in moderate und ausgeprägte Mukositis analog. Eine moderate Mukositis bedeutet, dass der WHO-Wert <3 beträgt, eine ausgeprägte Mukositis liegt bei einem WHO-Wert ≥ 3 vor.

3.10. Statistische Auswertung

Zur Analyse von empirischen Zusammenhängen in der Inferenzstatistik wurden hier die folgenden Verfahren eingesetzt: Der *T-Test für Mittelwertgleichheit* wird verwendet, um zu überprüfen, ob die Patienten, die starke Nebenwirkungen (Mukositis) aufweisen, im Vergleich zu den Patienten, die schwache Nebenwirkungen zeigen, im Durchschnitt mehr DNA-DSB in Blutlymphozyten nach erfolgter ex-vivo Bestrahlung aufweisen. Dieser Test wurde jedoch nur eingesetzt, wenn eine Normalverteilungsannahme und die Varianzgleichheit vorlagen. Um letztere zu prüfen, werden in der vorliegenden Arbeit der Shapiro-Wilk-Test (für kleine Stichproben) und der Levene Test für Varianzgleichheit eingesetzt. Die *nominale Zusammenhangsanalyse* basierte auf dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest und dem daraus abgeleiteten Kontingenzkoeffizienten. Diese wurden eingesetzt, um zu analysieren, ob

tatsächlich ein statistischer Zusammenhang besteht, dass Patienten mit einer größeren Anzahl an DNA-DSB in Blutlymphozyten nach erfolgter ex-vivo Bestrahlung auch stärkere Nebenwirkungen aufweisen. Die *ordinale Zusammenhangsanalyse* referenziert auf die beiden Rangkorrelationsmaße Kendall-Tau-b und Spearman-Rho. Diese wurden verwendet, um zu bestimmen, ob neben einem Zusammenhang auch eine statistisch signifikante Richtung mit angegeben werden kann. Sie dient daher der Analyse, ob folgende Aussage richtig ist: „Je besser DNA-Schäden in Blutlymphozyten nach ex-vivo Bestrahlung repariert werden, desto geringer sind die auftretenden Nebenwirkungen“.

4. Ergebnisse

4.1 Induzierte γ -H2AX Foci

Die nachfolgende Tabelle (4.1) zeigt über alle n=31 Patienten aggregiert die Zahl der induzierten γ -H2AX Foci der ex-vivo Bestrahlung der Blutlymphozyten für verschiedene Bestrahlungsdosen zum Zeitpunkt 0,5h nach erfolgter Bestrahlung. Aus der Tabelle lässt sich ablesen, wie viele der gezählten Blutlymphozyten jeweils 1-8 Foci aufweisen. Dabei zeigt sich, dass mit steigender Bestrahlungsintensität die Anzahl der Zellen steigt, die mehr Foci pro Zelle aufweisen. Beispielsweise weisen für 10 mGy die meisten Zellen <3 Foci pro Zelle auf, wohingegen für 500 mGy die meisten Zellen mehr als >3 Foci pro Zelle zählen. Die 30 min-Induktion bestätigt hiermit somit, dass mit steigender Bestrahlungsdosis die Zahl der induzierten Foci steigt. Für die weiteren Reparaturkinetiken müssen auch die gezählten Foci zu den späteren Messzeitpunkten berücksichtigt werden.

Tabelle 4.1: γ -H2AX DSB – 30 Minuten nach ex-vivo Bestrahlung

	30 Minuten nach ex-vivo Bestrahlung: Anzahl der Zellen für verschiedene Dosen				
γ -H2AX DSB	10mGy	20mGy	40 mGy	100 mGy	500 mGy
Null Foci pro Zelle	8265	5559	3803	1546	342
Ein Foci pro Zelle	972	1018	990	852	269
Zwei Foci pro Zelle	288	400	505	842	504
Drei Foci pro Zelle	75	100	195	415	724
Vier Foci pro Zelle	9	25	43	144	794
Fünf Foci pro Zelle	1	5	13	51	841
Sechs Foci pro Zelle	1	0	0	12	484
Sieben Foci pro	1	0	0	1	214
Acht Foci pro Zelle	0	0	0	0	117
Total	9613	7107	5548	3863	4288

Quelle: Eigene Darstellung

4.2 Reparaturquotient (Reparatur von DSB)

Die folgende Tabelle (4.2) zeigt die Reparaturquotienten für die unterschiedlichen, in vitro applizierten Bestrahlungsdosen anhand von arithmetischen Mittelwerten über alle Patienten. Für den ersten Messzeitpunkt nach Bestrahlung (nach 0,5h) zeigt sich, dass mit steigender Bestrahlungsdosis auch die Anzahl der induzierten Foci pro Zelle zunimmt, d.h. bei 10 mGy wird ein Wert von 0,19 Foci/gezählte Lymphozyten, bei 500 mGy ein Wert von 3,86 Foci/gezählte Lymphozyten im Durchschnitt beobachtet. Für alle Bestrahlungsdosen 10 mGy bis 500 mGy ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl der Foci/gezählte Lymphozyten höher liegt als der Kontrollwert (ohne Bestrahlung) und von der ersten Messung nach 0,5h bis zur letzten Messung nach 5h abfällt.

**Tabelle 4.2: Anzahl der Foci / gezählte Lymphozyten
für verschiedene Bestrahlungsdosen (n=31)**

Bestrahlungsdosis	Kontrollwert	0.5 h†	2.5 h†	5 h†	Reparaturquotient
10mGy	0,08 (±0,00)	0,19 (±0,00)	0,15 (±0,00)	0,12 (±0,00)	0,61 (±1%)
20mGy	0,08 (±0,00)	0,31 (±0,00)	0,22 (±0,00)	0,18 (±0,00)	0,57 (±1%)
40mGy	0,08 (±0,00)	0,50 (±0,01)	0,34 (±0,00)	0,25 (±0,00)	0,50 (±1%)
100mGy	0,08 (±0,00)	1,2 (±0,06)	0,77 (±0,04)	0,51 (±0,04)	0,42 (±1%)
500mGy	0,08 (±0,00)	3,86 (± 0,2)	2,6 (±0,28)	1,81 (±0,24)	0,47 (±1%)

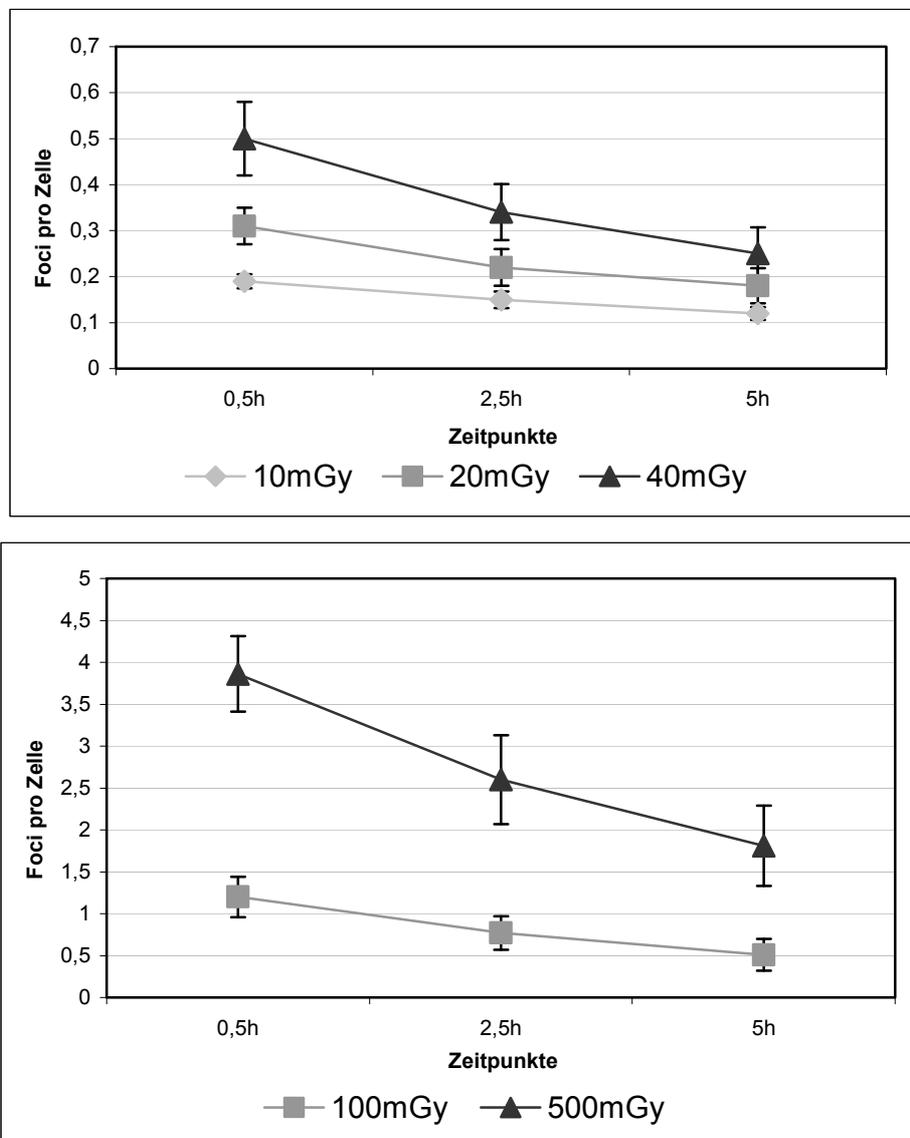
Die Tabelle zeigt die jeweiligen Mittelwerte und dazugehörigen Varianzen.

Quelle: Eigene Darstellung

Der Reparaturquotient beträgt bei 10 mGy 0,61 bei 20mGy bei 0,57, bei 40mGy bei 0,50, bei 100mGy bei 0,42 und bei 500mGy bei 0,47. In Summe lässt sich feststellen, dass dieser mit steigender Bestrahlungsdosis abnimmt. Dies bedeutet, dass nach 5h bei 500mGy Dosis noch 47% der initial gemessenen Foci pro Zelle während bei 10mGy Dosis noch 61% der initial gemessenen Foci pro Zelle vorliegen. Damit wird deutlich, dass bei steigender Bestrahlungsdosis zum einen nach 0,5h mehr Foci pro Zelle initiiert werden, diese jedoch auch schneller / stärker wieder abgebaut werden. Interessant ist hier auf den ersten Blick die Reihe 100mGy, da bei dieser der Reparaturquotient mit 42% noch niedriger liegt als bei

500mGy mit 47%. Allerdings nehmen die Varianzen mit steigender Bestrahlungsdosis auch zu. Die niedrigeren Bestrahlungsdosen sind wichtig, um insbesondere für den Zeitpunkt 0,5h zu überprüfen, inwieweit ein lineares Verhältnis zwischen Dosis und Fociinduktion besteht. Da dies aus den Daten bestätigt wird, ist eine höhere Validität des Zählverhaltens gegeben. Da die Fociinduktion selbstredend bei 100 und 500 mGy höher ist, liegt bei dieser Bestrahlungsdosis immer ein günstigeres "Signal-Rausch-Verhältnis" vor, das die Interpretation bei den niedrigen Dosen erschwert. Eine fast analoge Darstellung findet sich in Abbildung (4.1). Hier werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 4.1: Anzahl der Foci / gezählte Lymphozyten für verschiedene Bestrahlungsdosen in verschiedenen Zeitpunkten (n=31)

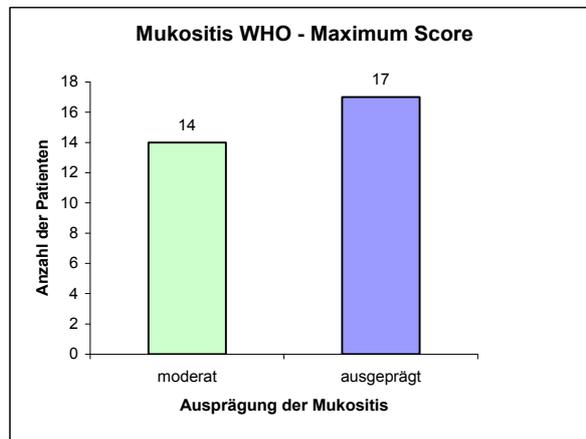


Quelle: Eigene Darstellung

4.3 Schweregrad akuter Nebenwirkungen (Mukositis)

Die nachfolgenden Abbildungen (4.2) und (4.3) zeigen nun die Ergebnisse der Mukositis innerhalb der Studie - jeweils für die Maximum- und die Medianmethode.

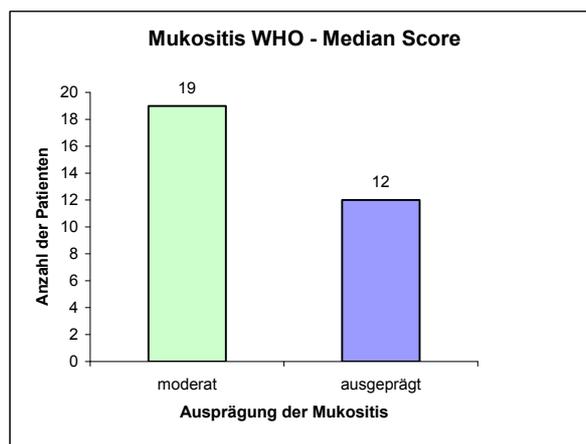
Abbildung 4.2: Mukositis WHO – Maximum Score (n=31)



Quelle: Eigene Darstellung

Die Abbildung zeigt, dass von den insgesamt 31 Patienten in der Studie während des Beobachtungszeitraums von 6 Wochen 14 Patienten eine moderate Mukositis entwickelten und 17 Patienten eine ausgeprägte Mukositis aufwiesen.

Abbildung 4.3: Mukositis WHO – Median Score (n=31)



Quelle: Eigene Darstellung

Mit der Median-Methode zeigt sich für 19 Patienten eine moderate und für nur 12 Patienten eine ausgeprägte Mukositis. Es zeigt sich, dass bei der Maximum-Methode eine höhere

Anzahl an Patienten mit ausgeprägter Mukositis zu finden ist, während dies bei der Median-Methode umgekehrt der Fall ist.

4.4 Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis

4.4.1 Test auf Mittelwertgleichheit

Beim Test für Mittelwertdifferenzen werden die Mittelwerte eines Merkmals in zwei verschiedenen Gruppen auf signifikante Unterschiede geprüft, d.h. es wird hier untersucht, ob sich die Mittelwerte des Reparaturquotienten in der Gruppe „Patienten mit ausgeprägter oraler Mukositis“ von der Gruppe „Patienten mit moderater oraler Mukositis“ unterscheiden. Dies erfolgt zum einen bezogen auf die WHO Score-Maximum und zum anderen auf die WHO Score – Median Methode. Die Ergebnisse für die WHO Score – Maximum Methode zeigen:

**Tabelle 4.3: Ergebnisse des T-Test auf Mittelwertgleichheit
(Maximum-Methode; n=31)**

	WHO (Maximum)	n	Mittelwert	Standard- abweichung
Reparatur- quotient bei 500 mGy	≥ 3	18	49,5	9,9
	< 3	13	42,6	9,5

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		F	Signifi- kanz	T	Sig. (2-seitig)
Reparatur- quotient bei 500 mGy	Varianzen sind gleich	,06	,81	1,96	,06

Quelle: Eigene Berechnungen

Der Mittelwert für die Reparaturquotienten liegt bei der Gruppe der „Patienten mit ausgeprägter oraler Mukositis“ bei 49,5 und bei der Gruppe der „Patienten mit moderater Mukositis“ bei 42,6. Der T-Test auf Mittelwertgleichheit ergibt nun eine Prüfgröße $T = 1,96$ mit einer 2-seitigen Signifikanz von $p=0,06$. Dies bedeutet, dass der mittlere Reparaturquotient der „Patienten mit ausgeprägter oraler Mukositis“ sich signifikant von dem der „Patienten mit moderater Mukositis“ unterscheidet. Der Levene Test bestätigt dabei die Grundvoraussetzung der Varianzgleichheit (Prüfgröße $F=0,06$; Signifikanz $p=0,81$).

Die Ergebnisse für den T-Test für den WHO Score – Median Methode zeigen sich wie folgt:

**Tabelle 4.4 : Ergebnisse des T-Test auf Mittelwertgleichheit
(Median-Methode; n=31)**

	WHO (Median)	n	Mittelwert	Standard- abweichung
Reparatur- quotient bei 500 mGy	$\geq 3,00$	12	51,1	9,8
	$< 3,00$	19	43,7	9,7

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		F	Signifi- kanz	T	Sig. (2-seitig)
Reparatur- quotient bei 500 mGy	Varianzen sind gleich	,001	,98	2,1	,047

Quelle: Eigene Berechnungen

Hierbei liegen die Mittelwerte für den Reparaturquotienten in den Gruppen „ausgeprägte versus moderate Mukositis“ mit 51,1 und 43,7 noch deutlicher auseinander. Der dazugehörige T-Test auf Mittelwertgleichheit zeigt hier eine Prüfgröße von $T = 2,1$ mit einem 2-seitigen

Signifikanzniveau von $p=0,047$. Die nötige Voraussetzung der Varianzgleichheit ist gegeben ($F=0,001$; Signifikanzniveau $p=0,98$). Damit unterscheiden sich beide Gruppen in ihrem mittleren Reparaturquotienten statistisch signifikant voneinander.

4.4.2 Nominale Zusammenhangsanalyse

Die Patienten werden hinsichtlich ihres Reparaturquotienten für die erfolgte ex-vivo Bestrahlung in drei Gruppen eingeteilt. Dies ist nötig, um das metrische Merkmal Reparaturquotient in ein nominales Merkmal zu transformieren:

- *Günstiger Reparaturquotient*: Patienten, bei denen nach 5 Stunden noch weniger als 39 Prozent der nach einer halben Stunde vorhandenen Foci vorliegen.
- *Mittlerer Reparaturquotient*: Patienten, bei denen nach 5 Stunden mehr als 39 Prozent und weniger als 61 Prozent des nach einer halben Stunde vorhandenen Foci vorliegen.
- *Ungünstiger Reparaturquotient*: Patienten, bei denen nach 5 Stunden noch mehr als 61 Prozent der nach einer halben Stunde vorhandenen Foci vorliegen.

Beginnend mit dem Ansatz *WHO Score – Maximum Methode* zeigt die nachfolgende Kreuztabelle die Aufteilung der Patienten infolge der gezeigten „Nominalisierung“ der beiden Merkmale in die verschiedenen Gruppen.

Tabelle 4.5: Kreuztabelle nach Maximum Methode (n=31)

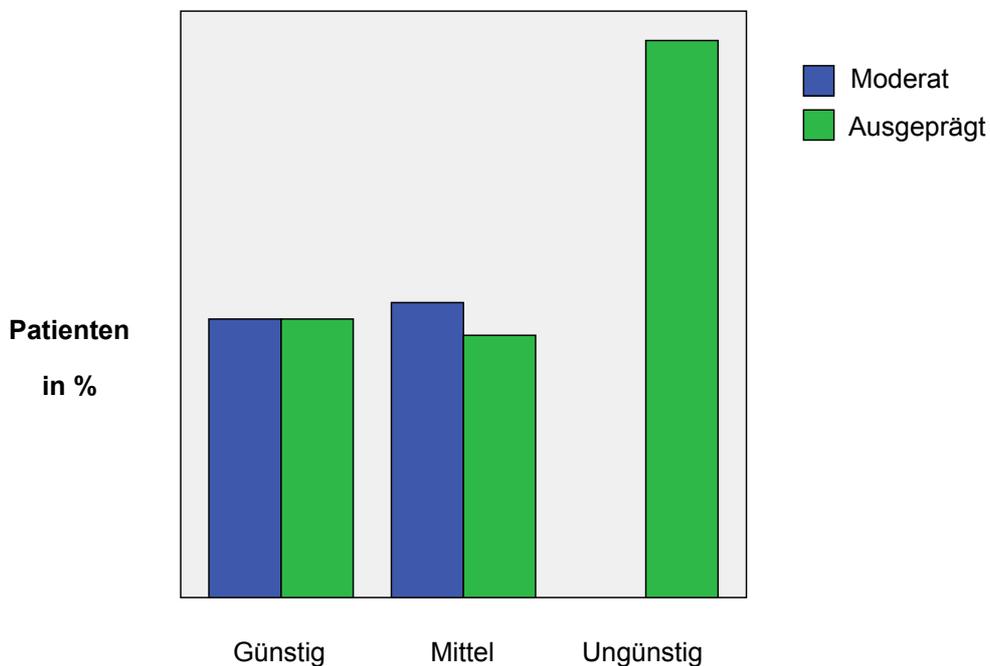
Ex vivo: 500 mGy		Mukositis (WHO – Maximum)		Gesamt
		Moderat	Ausgeprägt	
Reparaturquotient	Günstig	4	4	8
	Mittel	9	8	17
	Ungünstig	0	6	6
Gesamt		13	18	31

Quelle: Eigene Berechnungen

Die analoge graphische Darstellung zeigt die nächste Abbildung. Auffällig ist hier besonders, dass keiner der Patienten aus der Gruppe mit ungünstigem Reparaturanteil eine moderate Mukositis aufweist.

Noch deutlicher wird dies im unteren Teil der nächsten Abbildung (4.4), denn hier wird dies nach der Normierung in den Klassen des Reparaturquotienten auf jeweils 100 Prozent abgebildet und damit nochmals deutlicher visualisiert. Auffällig ist, dass die Gruppe mit ungünstigem Reparaturquotienten vollständig eine ausgeprägte Mukositis aufweist (grüner Balken ganz rechts), während sich in den anderen beiden Gruppen keine klare Tendenz erkennen lässt. Dies ist ein Indiz für den vermuteten Zusammenhang zwischen dem Reparaturquotienten und dem Schweregrad der akuten Nebenwirkungen (orale Mukositis). Dies wird in der folgenden nominalen Zusammenhangsanalyse genauer evaluiert.

Abbildung 4.4: Reparaturquotient vs. Mukositis (Maximum Mth.; n=31)



Quelle: Eigene Darstellung

Tabelle 4.6: Nominale Zusammenhangsanalyse (Maximum Mth.; n=31)

	Wert	Exact Sig. (zwei-seitig)
Pearson Chi-Square	5,4	,078
Kontingenzkoeffizient	,385	,078

Quelle: Eigene Berechnungen

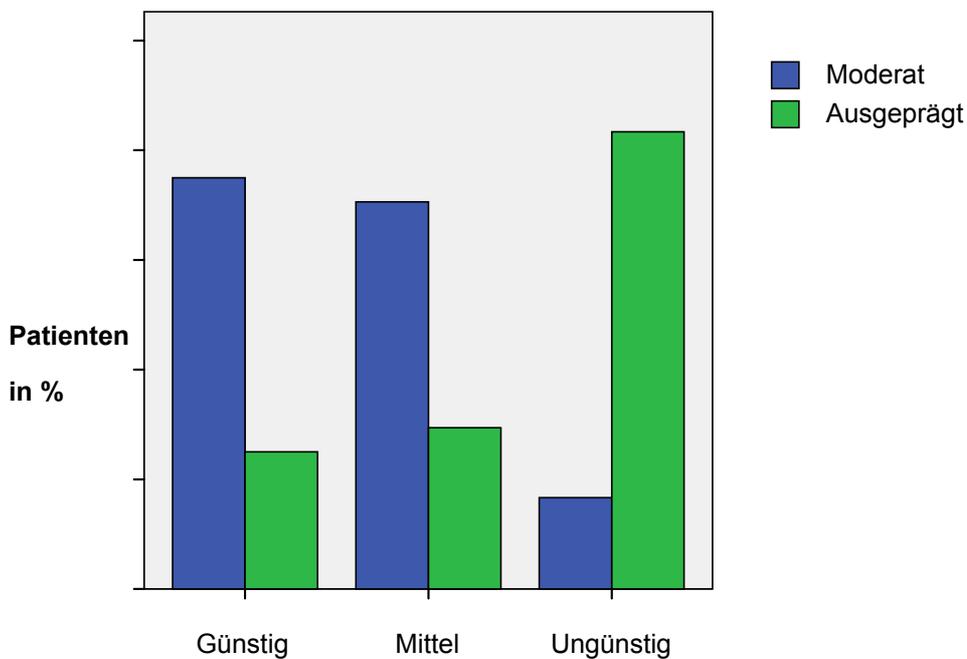
So zeigt der exakte Test für Chi-Quadrat an, dass für den berechneten Chi-Quadrat Wert von 5,4 ein zweiseitiges Signifikanzniveau von $p=0,078$ gegeben ist. Dadurch ist statistisch signifikant ein Zusammenhang ausgewiesen. Der Kontingenzkoeffizient als Normierung von Chi-Quadrat weist einen Wert von 0,385 auf, was bedeutet, dass ein mittelschwacher Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis mit einem Signifikanzniveau von $p=0,078$ vorliegt. Die identische Analyse für den WHO Score – Median Methode zeigt folgendes Bild. Die Abbildungen und Tabellen sind in Analogie zu oben zu interpretieren.

Tabelle 4.6: Kreuztabelle nach Median Methode

Ex vivo: 500 mGy		Mukositis (WHO – Median)		Gesamt
		Moderat	Ausgeprägt	
Reparaturquotient	Günstig	6	2	8
	Mittel	12	5	17
	Ungünstig	1	5	6
Gesamt		19	12	31

Quelle: Eigene Berechnungen

Abbildung 4.5: Reparaturquotient vs. Mukositis (Median Mth.; n=31)



Quelle: Eigene Darstellung

Der anzuwendende exakte Test für Chi-Quadrat zeigt an, dass für den berechneten Chi-Quadrat Wert von 6,3 ein Signifikanzniveau von $p=0,060$ gegeben ist. Der Kontingenzkoeffizient weist einen Wert von 0,411 bei einem Signifikanzniveau von $p=0,060$ auf und zeigt auch hier, dass der vermutete Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis besteht und mittelschwach ist.

**Tabelle 4.7: Nominale Zusammenhangsanalyse
(Median Mth.; n=31)**

	Wert	Exact Sig. (zwei-seitig)
Pearson Chi-Square	6,3	,060
Kontingenzkoeffizient	,411	,060

Quelle: Eigene Darstellung

4.4.3 Ordinale Zusammenhangsanalyse

Die ordinale Zusammenhangsanalyse ermöglicht es zu überprüfen, ob zwischen Reparaturquotient und akuten Nebenwirkungen (orale Mukositis) ein richtungsgebundener Zusammenhang besteht.

**Tabelle 4.8: Ordinale Zusammenhangsanalyse
(Maximum Mth.; n=31)**

			Ex vivo: 500 mGy Reparaturquotient
Kendall-Tau-b	Mukositis (WHO- Maximum)	Korrelationskoeffizient	,222
		Sig. (2-seitig)	,122
		N	31
Spearman-Rho	Mukositis (WHO- Maximum)	Korrelationskoeffizient	,272
		Sig. (2-seitig)	,138
		N	31

Quelle: Eigene Berechnungen

Für den Ansatz des WHO Scores nach Maximum Methode ergibt sich für den Korrelationskoeffizienten nach Kendall-Tau-b ein Wert von 0,222 bei einem Signifikanzniveau von $p=0,122$. Nach Spearman-Rho ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,272 mit einem dazugehörigen Signifikanzniveau von $p=0,138$. Dies entspricht einem schwachen und positiven Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und akuten Nebenwirkungen (orale Mukositis).

**Tabelle 4.9: Ordinale Zusammenhanganalyse
(Median Mth.; n=31)**

			Ex vivo: 500 mGy Reparaturquotient
Kendall-Tau-b	Mukositis (WHO- Maximum)	Korrelationskoeffizient	,307
		Sig. (2-seitig)	,031
		N	31
Spearman-Rho	Mukositis (WHO- Maximum)	Korrelationskoeffizient	,375
		Sig. (2-seitig)	,038
		N	31

Quelle: Eigene Berechnungen

Für den Ansatz des WHO Score - Median Methode zeigt sich ein deutlicherer Zusammenhang zwischen den Merkmalen Reparaturquotient und Mukositis. Denn die Korrelationskoeffizienten sowohl nach Kendall-Tau-b als auch nach Spearman-Rho liegen mit den Werten 0,307 und 0,375 deutlich höher und entsprechen einem mittelschwachen positiven Zusammenhang. Auch die dazugehörigen Signifikanzniveaus von $p=0,031$ und $p=0,038$ weisen deutlich günstigere Fehlerwahrscheinlichkeiten auf.

4.5 Analyseergebnisse für Patienten ohne Chemotherapie

4.5.1 Test auf Mittelwertgleichheit

Für den Ansatz des WHO Score – Maximum Methode liegt hier der Mittelwert für den Reparaturquotienten bei der Gruppe der „Patienten mit ausgeprägter Mukositis“ bei 50,0 und bei der Gruppe der „Patienten mit moderater Mukositis“ bei 39,3. Der T-Test auf

Mittelwertgleichheit ergibt nun eine Prüfgröße $T = 2,2$ mit einer 2-seitigen Signifikanz von $p=0,047$. Die Voraussetzung, dass die Varianzen gleich sind, ist gegeben (Signifikanz von Levene Test von $p=0,209$). Damit unterscheidet sich der mittlere Reparaturquotient der „Patienten mit ausgeprägter Mukositis“ signifikant von dem der „Patienten mit moderater Mukositis“.

**Tabelle 4.10: Ergebnisse des T-Test auf Mittelwertgleichheit
(Maximum Methode, n=15)**

	WHO (Maximum)	N	Mittelwert	Standard- abweichung
Reparatur- quotient bei 500 mGy	$\geq 3,00$	10	50,0	7,42
	$< 3,00$	5	39,3	11,67

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		F	Signifi- kanz	T	Sig. (2-seitig)
Reparatur- quotient bei 500 mGy	Varianzen sind gleich	1,745	,209	2,2	,047

Quelle: Eigene Berechnungen

Für den Ansatz des WHO Score – Median Methode liegen die Mittelwerte für den Reparaturquotienten in den Gruppen „starke ausgeprägter vs. moderate Mukositis“ mit 51,8 und 40,4 noch einmal etwas deutlicher auseinander als für den oben gezeigten WHO Score nach Maximum Methode. Der dazugehörige T-Test auf Mittelwertgleichheit zeigt hier eine Prüfgröße von $T = 2,6$ mit einem klareren 2-seitigen Signifikanzniveau von $p=0,023$ (Gleichheit der Varianzen ist wichtig siehe Levene Test mit Signifikanzniveau von $p=0,124$).

**Tabelle 4.11: Ergebnisse des T-Test auf Mittelwertgleichheit
(Median Methode, n=15)**

	WHO (Median)	N	Mittelwert	Standard- abweichung
Reparatur- quotient bei 500 mGy	≥ 3,00	8	51,73	6,34
	< 3,00	7	40,38	10,51

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit	
		F	Signifi- kanz	T	Sig. (2-seitig)
Reparatur- quotient bei 500 mGy	Varianzen sind gleich	2,70	,124	2,573	,023

Quelle: Eigene Berechnungen

4.5.2 Nominale Zusammenhangsanalyse

Da es sich bei den Patienten ohne Chemotherapie nur um 15 Personen handelt, wird der Reparaturquotient nicht in drei sondern in zwei Gruppen eingeteilt. Dies ist eine nötige Voraussetzung, um die nominalen Zusammenhangsanalysen durchführen zu können, womit vermieden wird, dass die Untergruppen zu klein werden:

- *Günstiger Reparaturquotient*: Patienten, bei denen nach 5 Stunden noch weniger als 46,3 Prozent der nach einer halben Stunde vorhandenen DSB vorliegen, d.h. sie konnten über 53,7 Prozent der DSB reparieren.
- *Ungünstiger Reparaturquotient*: Patienten, bei denen nach 5 Stunden noch mehr als 46,3 Prozent der nach einer halben Stunde vorhandenen DSB vorliegen, d.h. sie konnten weniger als 53,7 Prozent der DSB reparieren.

Für den Ansatz WHO Score – Maximum Methode zeigt die nachfolgende Kreuztabelle (4.12) die Aufteilung der Patienten für die beiden Merkmale. Es zeigt sich, dass von den 11 Patienten, die einen ungünstigen Reparaturquotienten aufweisen, auch nur 2 eine moderate, 9 allerdings eine ausgeprägte Mukositis aufweisen. Die umgekehrte Tendenz zeigt sich für die 4 Patienten mit günstigem Reparaturquotienten. Denn 3 zeigen eine moderate und 1 Patient eine ausgeprägte Mukositis.

**Tabelle 4.12: Kreuztabelle für die nominale Zusammenhangsanalyse
(Maximum Mth., n=15)**

Ex vivo: 500 mGy		Mukositis (WHO – Maximum)		Gesamt
		Moderat	Ausgeprägt	
Reparaturquotient	Günstig	3	1	4
	Ungünstig	2	9	11
Gesamt		5	10	15

Quelle: Eigene Berechnungen

Das dazugehörige Chi-Quadrat zeigt mit einem Wert von 4,3 und mit einem Signifikanzniveau von 0,077 an, dass ein Zusammenhang auch hier vorliegt. Der Kontingenzkoeffizient liegt bei der hier vorgenommenen Einschränkung auf nur Nicht-Chemotherapie Patienten bei 0,470 mit einem dazugehörigen Signifikanzniveau nach exaktem Test mit $p=0,077$.

**Tabelle 4.13: Ergebnisse der nominalen Zusammenhangsanalyse
(Maximum Mth., n=15)**

	Wert	Exact Sig. (zwei-seitig)
Pearson Chi-Square	4,3	,077
Kontingenzkoeffizient	,470	,077

Quelle: Eigene Berechnungen

Für den Ansatz WHO Score – Median Methode bildet nun ebenfalls die nachfolgende Kreuztabelle die Aufteilung der Patienten auf die beiden Merkmale ab.

**Tabelle 4.14: Kreuztabelle für die nominale Zusammenhangsanalyse
(Median Mth., n=15)**

Ex vivo: 500 mGy		Mukositis (WHO - Median)		Gesamt
		Moderat	Ausgeprägt	
Reparaturquotient	Günstig	4	0	4
	Ungünstig	3	8	11
Gesamt		7	8	15

Quelle: Eigene Berechnungen

Denn alle 4 Patienten mit günstigem Reparaturquotienten zeigen eine schwache Mukositis. Bei den 11 Patienten mit ungünstigem Reparaturquotienten weisen 3 eine moderate und 8 eine ausgeprägte Mukositis auf. Das dazugehörige Chi-Quadrat weist einen Wert von 6,3 und ein Signifikanzniveau von $p=0,026$ aus. Der Kontingenzkoeffizient weist mit einem Wert von 0,542 einen klaren, mittleren Zusammenhang bei einem Signifikanzniveau von $p=0,026$ aus.

**Tabelle 4.15: Ergebnisse der nominalen Zusammenhangsanalyse
(Median Mth., n=15)**

	Wert	Exact Sig. (zwei-seitig)
Pearson Chi-Square	6,3	,026
Kontingenzkoeffizient	,542	,026

Quelle: Eigene Berechnungen

4.5.3 Ordinale Zusammenhangsanalyse

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für die Maximum Methode gibt einen Wert von 0,366 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,18$ an. Dies entspricht einem mittleren positiven Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis. Allerdings ist das Signifikanzniveau eher schwach und vermutlich auf die vergleichsweise geringe Fallzahl von nur 15 Patienten zurückzuführen, weshalb eine Verallgemeinerung dieser Analyse nicht möglich ist.

**Tabelle 4.16: Ergebnisse der ordinalen Zusammenhangsanalyse
(Maximum Mth., n=15)**

			Ex vivo: 500 mGy Reparaturquotient
iSpearman-Rho	Mukositis (WHO- Maximum)	Korrelationskoeffizient	,366
		Sig. (2-seitig)	,180
		N	15

Quelle: Eigene Berechnungen

Für den Ansatz der Median Methode zeigt der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman einen Wert von 0,481 mit einem dazugehörigen Signifikanzniveau von $p=0,07$. Dies entspricht einem positiven mittleren Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis, der statistisch signifikant bestätigt wird.

**Tabelle 4.17: Ergebnisse der ordinalen Zusammenhangsanalyse
(Median Mth., n=15)**

			Ex vivo: 500 mGy Reparaturquotient
Spearman-Rho	Mukositis (WHO- Median)	Korrelationskoeffizient	,481
		Sig. (2-seitig)	,070
		N	15

Quelle: Eigene Berechnungen

5. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen, die eine unterdurchschnittliche ex-vivo DNA-DSB-Reparatur aufweisen, ein höheres Risiko für die Entwicklung einer ausgeprägten oralen Mukositis unter Bestrahlung haben. Um dies zu beurteilen und interindividuell miteinander vergleichen zu können, wurde mittels der γ -H2AX Methode die Anzahl der Foci pro Zelle in Blutlymphozyten nach 0,5h, 2,5 und nach 5h im Anschluss an die Bestrahlung mit 500 mGy gemessen. Aus diesen Daten wurde ein Reparaturquotient gebildet, um zu überprüfen, ob zwischen diesem und der infolge der therapeutischen Bestrahlung auftretenden Mukositis ein statistischer Zusammenhang besteht. In der Studie weisen die eingesetzten statistischen Zusammenhangsanalysen daraufhin, dass es für das untersuchte Kollektiv eine Assoziation des Reparaturquotienten bei der ex-vivo Blut-Bestrahlung mit der Dosis von 500 mGy und der therapieinduzierten Mukositis gibt. Für die anderen betrachteten Bestrahlungsdosen 10mGy, 20mGy, 40mGy und 100mGy konnten jedoch diese statistisch signifikanten Zusammenhänge nicht nachgewiesen werden. So war auch bei den niedrigeren Bestrahlungsdosen 10 mGy bis 100 mGy erkennbar, dass die Anzahl der Foci/gezählte Lymphozyten höher lag als der Kontrollwert (ohne Bestrahlung) und dass diese von der ersten Messung nach 0,5h bis zur letzten Messung nach 5h abfielen. Eine mögliche Erklärung, dass hier kein Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und therapieinduzierter Mukositis nachgewiesen werden konnte, könnte darin bestehen, dass die niedrigen Bestrahlungsdosen dazu führen, dass nach 30 Minuten eher weniger DNA-DSB vorliegen, d.h. die initiierten Schädigungen und die folgende Reparatur geringer sind. Bei höheren Bestrahlungsdosen sind nach 30 Minuten hingegen eher mehr DNA-DSB vorhanden, d.h. die initiierten Schädigungen und die anknüpfende Reparatur sind höher. In der Studie sind somit die Ergebnisse für die ex-vivo Bestrahlung mit 500mGy aufgrund des eben erläuterten günstigeren „Signal-Rausch-Verhältnis“ am interessantesten.

Die infolge der therapeutischen Bestrahlung über mehrere Wochen gemessene Mukositis wurde hierbei sowohl mittels der Maximum- als auch der Median-Methode statistisch dargestellt. Die Median-Methode ist statistisch weniger verzerrend, da hier im Durchschnitt ermittelt wurde, wie lang die Mukositis eines definierten Schweregrades über die Zeit andauerte. Die Maximum-Methode ist statistisch auf Extremwerte ausgerichtet, denn hier wurde nur der stärkste Wert der Mukositis innerhalb dieser Wochen ohne Berücksichtigung ihrer Dauer einbezogen. Daher sind die Zusammenhangsergebnisse für beide Methoden

interessant. Hier werden noch einmal kurz die wichtigsten Ergebnisse der Studie zusammenfassend für die Bestrahlungsdosis 500mGy diskutiert. Für beide Methoden konnten dabei statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Mukositis und dem Reparaturquotienten (N=31) nachgewiesen werden:

Der T-Test auf Mittelwertgleichheit zeigte, dass sich der Reparaturquotient bei moderater und ausgeprägter Mukositis unterscheidet. In der Gruppe der Patienten mit moderater Mukositis war er niedriger – Mittelwert von 42,6% (Maximum-Mth.) und 43,7% (Median-Mth.), in der Gruppe mit ausgeprägter Mukositis war er höher – Mittelwert von 49,5% (Maximum-Mth.) und 51,1% (Median-Mth.). In beiden Fällen war eine (grenzwertige) statistische Signifikanz von $p=0,061$ (Maximum-Mth.) und $p=0,047$ (Median-Mth.) gegeben.

Die nominale Zusammenhangsanalyse weist einen mittelschwachen Zusammenhang zwischen Reparaturquotienten und Mukositis für beide Methoden aus:

- Maximum-Mth.: Beispielsweise hatten 6 Patienten einen ungünstigen Reparaturquotienten, von denen alle danach eine ausgeprägte Mukositis aufwiesen. Der Kontingenzkoeffizient lag hier bei 0,385 und war mit $p=0,078$ signifikant.
- Median-Mth.: Beispielsweise hatten 6 Patienten einen ungünstigen Reparaturquotienten, von denen 5 danach eine ausgeprägte und nur ein Patient eine moderate Mukositis aufwiesen. Der Kontingenzkoeffizient lag hier bei 0,41 und war mit $p=0,06$ signifikant.

In der Schlussfolgerung deuten die Daten darauf hin, dass Patienten, die ex-vivo über einen ungünstigeren Reparaturquotienten in ihren Blutlymphozyten verfügen, eine vergleichsweise höhere Wahrscheinlichkeit besitzen, in der folgenden therapeutischen Bestrahlung mit weniger starken Nebenwirkungen zu reagieren. Patienten weisen einen ungünstigen (mittleren) [günstigen] Reparaturquotienten aus, wenn nach 5h noch $>61\%$ ($<39\%$ und $<61\%$) [$<39\%$] der nach 0,5h vorhanden Foci vorliegen.

Die ordinale Zusammenhangsanalyse erweiterte nun die Ergebnisse, indem sie einen mittelschwachen positiven Zusammenhang zwischen Reparaturquotient und Mukositis aufzeigte, d.h. je niedriger der Reparaturquotient von Patienten in der ex-vivo Bestrahlung ihrer Blutlymphozyten war, umso schwächer war ihre Mukositis bei der therapeutischen Bestrahlung. Dies wurde durch den Korrelationskoeffizient nach Spearman für beide Methoden angezeigt. Denn dieser lag bei 0,272 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,138$ (Maximum-Mth.) und bei 0,375 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,038$ (Median-Mth.).

In der Studie kann zudem festgestellt werden, dass der vermutete Zusammenhang noch deutlicher ist, wenn nur Patienten betrachtet werden, die keine zusätzliche Chemotherapie erhalten haben. Die interessantesten Ergebnisse zeigten sich für die Median-Methode (N=15): Der T-Test auf Mittelwertgleichheit zeigte, dass der Reparaturquotient in der Gruppe mit starker Mukositis einen Mittelwert von 51,7% (vs. 51,1% oben) und in der Gruppe mit schwacher Mukositis einen Mittelwert von 40,38% (vs. 43,7% oben) aufwies. Die statistische Signifikanz war mit $p=0,023$ zudem deutlicher (vs. $p=0,047$ oben).

Die nominale Zusammenhangsanalyse wies hier einen mittleren Zusammenhang auf: So reagierten von den 11 Patienten mit einem ungünstigem Reparaturquotienten 8 mit einer ausgeprägten Mukositis, während von den 4 Patienten mit einem günstigem Reparaturquotienten alle nur eine moderate Mukositis zeigten. Der sich hieraus ergebende Kontingenzkoeffizient lag bei 0,542 (vs. 0,41 oben) und war mit $p=0,026$ statistisch signifikanter (vs. $p=0,06$ oben). Die ordinale Zusammenhangsanalyse wies auf eine positive Richtung im Zusammenhang hin: Der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei 0,481 (vs. 0,375 oben) bei einem Signifikanzniveau von $p=0,07$ (vs. $p=0,038$ oben).

Natürlich spielen beim Auftreten der oralen Mukositis viele Faktoren eine wichtige Rolle. So sind neben den konstitutionellen Faktoren, Faktoren wie Mundhygiene und Anwendung der supportiven Therapie sehr wichtig. Dabei wurde beim Patientenkollektiv dieser Arbeit die Supportivtherapie bestmöglich kontrolliert und standardisiert. Die Patienten wurden in kurzen Zeitabständen dazu befragt, angeleitet und untersucht. Lediglich zu den Rauchgewohnheiten der Patienten, welche die orale Mukositis verstärken können, konnten keine verlässlichen Informationen gewonnen und daher nicht in die Analyse integriert werden.

Bezüglich der Vergleichbarkeit der oralen Mukositis aufgrund der unterschiedlichen Größe der Bestrahlungsfelder ist zu sagen, dass die Bestrahlungsvolumina (verglichen durch die 80%-Isodosen Linie) nur minimale interindividuelle Unterschiede zeigten, so dass Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen sich diesbezüglich wegen der guten Vergleichbarkeit als Studienteilnehmer eignen. Die Bestrahlungsfelder können so als Ursache für Unterschiede in der oralen Mukositis praktisch ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die Reparaturkinetik, welche in Blutlymphozyten gemessen wird, auch repräsentativ ist für andere Organe und Gewebe. So konnte in einer Studie mittels γ -H2AX Immunfluoreszenzmethode in Mausmodellen gezeigt werden (Rübe, et. al., 2008a), dass es sich um identische Kinetiken der DSB-Rejoining in verschiedenen

Organen der untersuchten Mäuse handelte. Zudem konnte dort anhand eines präklinischen Mausmodells gezeigt werden, dass die DNA-Reparatur, gemessen in Blutlymphozyten, repräsentativ ist für verschiedene solide Gewebe (Rübe, et. al, 2008b) Diese Ergebnisse zeigen die Unabhängigkeit der DNA-Reparatur von der Art des Gewebes.

Die Pathobiologie der oralen Mukositis ist sehr komplex. Diese wird nach Sonis zur Erklärung der Pathogenese in einem Modell multipler Mechanismen in 5 Phasen unterteilt: Aktivierung, die erste Reaktion auf den entstandenen Schaden, Meldung des Schadens, Verstärkung, Ulzeration und Heilung, um die Pathogenese zu erklären. (Sonis, et. al, 2007). In Hinsicht auf die Ausprägung radiogener Nebenwirkungen sind DNA-DSB und deren Reparatur von fundamentaler Bedeutung (Mc Millan, et al., 2001).

Dabei hat sich die γ -H2AX Methode in den letzten Jahren als verlässlicher Nachweis für DSB etabliert. So konnte in einer Studie festgestellt werden (Löbrich, et. al, 2005), dass eine Patientin, die schon in früher nach einer erfolgten Radiotherapie erhebliche Nebenwirkungen zeigte, auch in dieser erneuten Untersuchung in vivo erhebliche höhere γ -H2AX Foci als die übrigen Teilnehmer der Studie aufwies. Sowohl mit der γ -H2AX Methode und Pulsfeld – Gelelektrophorese in Fibroblasten konnte ein substantieller DSB Reparaturdefekt nachgewiesen werden. Auch wurde hierbei schon ex-vivo eine signifikante Radiosensitivität bei dieser Patientin mittels γ -H2AX Methode festgestellt.

Die γ -H2AX Methode erlaubt das Aufdecken von Reparaturdefiziten im NHEJ, welcher der dominante Reparaturmechanismus in Säugetierzellen ist. Ein wesentlicher Vorteil ist ihre geringe Nachweisgrenze von 0,1 mSv (Rothkamm und Löbrich et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die entstandenen γ -H2AX-Foci mit der Menge der induzierten DSB korrelieren (Rogakou et al., 1999; Sedelnikova et al., 2002; Rothkamm und Löbrich et al., 2003). Dabei wird der maximale Wert nach 15 bis 30 Minuten erreicht. Es handelt sich um eine sensitive Methode zur Messung der induzierten DSB, allerdings ist es aufgrund verschiedener Einflussfaktoren keine 1:1 Korrelation. (Löbrich, et.al, 2010). Allerdings weist die γ -H2AX Methode auch verschiedenen Limitierungen auf. So ist sie nicht in der Lage, Schädigungen in der homologen Rekombination, die auf die S-G2 Phase zurückzuführen sind, zu erkennen. Zudem registriert die γ -H2AX Methode im Gegensatz zu physischen Methoden der DSB Erkennung (z.B. Puls-Feld basierte Elektrophorese) lediglich metabolische Aktivitäten in den Zellen, die initiiert werden, um den DSB Reparaturprozess zu ermöglichen.

So konnten Diskrepanzen zwischen der tatsächlichen DSB-Reparatur und der Eliminierung von γ -H2AX-Foci zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden (Kinner, et al, 2008).

Auch lässt die γ -H2AX-Methode keine Rückschlüsse über die Qualität der erfolgten DSB-Reparatur zu, denn z.B. das Hinzufügen und die Eliminierung von DNA-Molekülen sowie nicht gelungene Re-Joining Ereignisse können mit ihr nicht dargestellt werden. In Summe bietet die γ -H2AX Methode zwei weitere wesentliche Vorteile gegenüber den bereits erwähnten, weshalb sie in der durchgeführten Studie zur intendierten Quantifizierung von DSB und damit der Reparaturkinetik geeignet ist. Zum einen kann sie unabhängig vom molekularen Hintergrund eingesetzt werden, wodurch eine weite Bandbreite von genetischen und epigenetischen Variationen, die die DSB Reparaturmechanismen beeinflussen, entdeckt werden können. Zum anderen sind Blutproben vor der Durchführung der therapeutischen Bestrahlung einfach zugänglich und kostengünstig, und so kann die γ -H2AX Analyse mittels eines Bluttests innerhalb relativ kurzer Zeit abgeschlossen werden. Die Ergebnisse wurden jedoch mit einer limitierten Anzahl von Patienten gewonnen und sind deshalb nicht gänzlich aussagekräftig.

In einer Studie, in der gesunde Kinder und solche mit Malignomerkrankungen untersucht wurden, konnte festgestellt werden, dass erkrankte Kinder eine ungünstigere Reparaturkapazität als gesunde Kinder aufweisen. (Rübe et al., 2010). Eine weitere Untersuchung des dieser Arbeit zu Grunde liegenden Patientenkollektivs wurde hinsichtlich des Einflusses der in-vivo Reparatur auf die auftretende Mukositis durchgeführt. Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass Patienten, bei denen 24h nach der therapeutischen in-vivo Bestrahlung mit 2Gy dann eine ausgeprägtere Mukositis festzustellen war, wenn die Anzahl der nicht reparierten DSB höher lag als im Mittel nach 24h. Allerdings unterschieden sich die Patienten, die eine ≥ 3 Mukositis (n=18) aufwiesen, nicht von den Patienten, die eine < 2 Mukositis zeigten (n=13) bezogen auf die Anzahl der nach 24h noch vorliegenden DSB (Fleckenstein, et. al., 2010).

Andere Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen Reparaturkapazität und Normalgewebsreaktionen nach erfolgter Therapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zeigt die Studie von Werbröck. Hier konnte kein statistischer Zusammenhang bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy zwischen der mittels γ -H2AX in vitro gemessenen Reparaturkinetik und dem Auftreten der Normalgewebskomplikationen in Form von Schluckbeschwerden, Mukositis und Dermatitis nachgewiesen werden. Dabei wurden in dieser Studie bei einem

Gesamtkollektiv 31 Patienten untersucht die verschiedene Therapieschemata erhielten. So erhielten 8 Patienten eine primäre Radiatio, 7 eine kombinierte primäre Radiochemotherapie. Operativ wurden insgesamt 16 Patienten behandelt, von denen jeweils 8 Patienten zusätzlich eine Radiatio und eine zusätzliche Radiochemotherapie erhielten. In dieser Studie wurden zusätzlich Patienten mit verschiedenen ATM Mutationen auf Unterschiede in der Reparaturkinetik untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese über weniger effiziente Reparaturmechanismen verfügen. (Werbrouck, et. al, 2010) Insgesamt unterscheidet sich der therapeutische Ansatz damit zu dem Vorgehen in dieser Studie. Auch wurden die Normalgewebsreaktionen anders definiert. Dies kann eine Auswirkung auf die auftretenden Normalgewebsreaktionen haben, die anders definiert wurden. Daher sind aufgrund der verschiedenen Limitierungen und Einflüsse weitere Studien nötig, ehe ein abschließendes Urteil darüber gefällt werden kann, ob und unter welchen Bedingungen die γ -H2AX Methode als prädiktiver Test zur Behandlungsverträglichkeit tatsächlich im Klinikalltag verwendet werden kann.

6. Appendix

A. TNM-Klassifikation für Kopf-Hals-Karzinome

1.) T-Klassifikation für Tumore der Mundhöhle, Oro- & Hypopharynx

T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm , aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen

2.) N- Regionäre Lymphknoten: für Tumoren der Mundhöhle, des Oro -und Hypopharynx

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem, ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	ipsilateral solitär , größer als 3cm und kleiner als 6cm in größter Ausdehnung
N2b	ipsilateral multipel, kleiner als 6cm in größter Ausdehnung
N2c	ipsilateral, kontralateral, kleiner als 6cm in größter Ausdehnung
N3	Metastasen in Lymphknoten mit mehr als 6cm Ausdehnung

3.) T-Klassifikation für Larynx-Tumoren der Supraglottis:

T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, normale Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor überschreitet Supraglottis, normale Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Stimmlippenfixation oder Überschreitung laryngealer Grenzen (Postkrikoid)
T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)
T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis int.

4.) T-Klassifikation für Larynx-Tumoren der Glottis:

T1	Tumor auf Stimmlippe begrenzt, erhaltene Stimmlippenbeweglichkeit (T1a: Befall einer Stimmlippe, T1b: beidseitiger Befall der Stimmlippen)
T2	Ausbreitung auf Supraglottis und/oder Subglottis und/oder eingeschränkte Stimmlippenbeweglichkeit (Einwachsen in Aryknorpelbereich)
T3	Tumor beschränkt sich auf Larynx mit Stimmlippenfixation
T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)
T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis int.

5.) T-Klassifikation von Larynx-Tumoren der Subglottis:

T1	Begrenzt auf Subglottis
T2	Erreicht Stimmlippe, Stimmlippen normal oder eingeschränkt beweglich
T3	Auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixation
T4a	Infiltration Schilddrüse u/o Nachbarstrukturen (Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus)
T4b	Infiltration Prävertebralraum, Mediastinum, A. carotis int.

6.) N- Lymphknotenstatus bei allen Larynx-Karzinomen:

N1	Lymphknotenmetastasen ipsilateral solitär kleiner gleich 3 cm Tumor überschreitet Organgrenzen (z.B. Trachea)
N2a	Ipsilateral solitär, > 3cm und < 6 cm
N2b	Ipsilateral multipel kleiner gleich 6 cm
N2c	Bilateral, kontralateral kleiner gleich 6 cm
N3	Lymphknotenmetastase größer als 6cm

Quelle: Weber et. al (2010).

B. Mukositiserhebungsbogen

Arbeitsblatt zur Mukositisbeurteilung

Patienteninitialien:	Beurteilungsdatum:
Woche: ____ Besuch ____	Beurteilungsbeginn:
Ernährung 1 : Bitte angeben, was der Patient derzeit zu sich nehmen kann: Feste Nahrung <input type="checkbox"/> Flüssige Nahrung <input type="checkbox"/>	
Ernährung 2 : Bei flüssiger Nahrung oder keine orale Nahrungsaufnahme liegt dies an der oralen Mukositis? Ja oder Nein. Wenn Nein, bitte fragen, was der Patient ausschließlich, aufgrund dessen, wie sich sein Mund anfühlt, meint zu sich nehmen zu können: Feste Nahrung <input type="checkbox"/> Flüssige Nahrung <input type="checkbox"/> Keine orale Nahrungsaufnahme <input type="checkbox"/>	
Schmerzen im Mund : Bitte angeben, ob der Patient Schmerzen oder Beschwerden im Mund hat: Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>	
Geschmack : Bitte angeben, ob das Geschmackempfinden des Patienten aufgrund der Krebsbehandlung verändert ist: Normal <input type="checkbox"/> Leicht verändert (z.B. metallischer Geschmack) <input type="checkbox"/> Deutlich verändert <input type="checkbox"/>	
Speichel : Bitte angeben, ob bei dem Patienten die Speichelbildung durch die Krebsbehandlung beeinträchtigt ist: Normal <input type="checkbox"/> Leicht verdickt <input type="checkbox"/> Dick, zähflüssig, klebrig <input type="checkbox"/> Nekrose, beeinträchtigt <input type="checkbox"/>	
Ulzeration Nein = Normale, intakte Schleimhaut P = Fleckige Ulzeration(en) oder Pseudomembran(en) belegen < 50% der betroffenen Schleimhautoberfläche C = Zusammenlaufende Ulzeration(en) oder Pseudomembran(en) belegen über > 50% der betroffenen Schleimhautoberfläche N = Nekrose NE = Nicht beurteilbar	Sonstige Ulzeration Nein = Keine Ulzerationen Ja = Tumor Ulzeration NE = Nicht beurteilbar
Erythem	
Nein = Rosarote Schleimhaut Ja = Schleimhaut ist gerötet NE = Nicht beurteilbar	

Appendix

Ort	Ulzeration/Bildung einer Pseudomembran betreffendes bitte einkreisen	Sonstige Ulzeration	Erythem
Oberlippe	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Unterlippe	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Rechte Wange	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Linke Wange	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Zunge rechts ventral und lateral	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Zunge links ventral und lateral	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Mundboden	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Weicher Gaumen	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE
Harter Gaumen	Nein P C N NE	Nein Ja NE	Nein Ja NE

Quelle: Eigene Darstellung

7. Literaturverzeichnis

1. **Abraham RT (2001)** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Development* 15: 2177-2196
2. **Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA (2002)** DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3758-3763
3. **Badie C, Goodhardt M, Waugh, A, Doyen N, Foray N, Calsou P, Singleton B, Gell D, Salles B, Jeggo P, Arlett CF, Malaise EP (1997)** A DNA double-strand break defective fibroblast cell line (180BR) derived from a radiosensitive patient represents a new mutant phenotype. *Cancer Res* 57: 4600-4607
4. **Bamberg M, Molls M, Sack H (eds) (2009)** Radioonkologie, Grundlagen und Klinik 1 und 2. Zuckschwerdt 2. Auflage
5. **Blöcher D, Sigut D, Hannan MA (1991)** Fibroblasts from ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assay by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat Biol* 60: 791-802
6. **Chen F, Peterson SR, Story, MD, Chen DJ (1996)** Disruption of DNA-PK in Ku80 mutant xrs-6 and the implications in DNA double-strand break repair. *Mut. Res* 362: 9-19
7. **De Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001)** Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* 8: 1129-1135
8. **Deutsche Krebsgesellschaft (2010)** Kopf-Hals-Tumoren - Überblick, Internetseite Stand 2010, http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_kopf_hals_tumor_definition,108162.html
Primärquelle:
Stasche N, Schmieder A (2010) Kopf-Hals-Karzinome, in: Dornoff W, Hagemann FG, Preiß J, Schmieder A (eds) Taschenbuch Onkologie 2010: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011. Zuckschwerdt Verlag: 137-144
9. **Digweed M, Sperling K (2004)** Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3: 1207-1217
10. **Durocher D, Jackson SP (2001)** DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 13: 225-231
11. **Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS (2007)** Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68: 1110-1120
12. **Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995)** The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59

13. **Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004)** H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3: 959-967
14. **Fietkau R, Müller RP, Iro H, (2007)** Adjuvante Behandlung von Tumoren der Kopf-Hals-Region. *Der Onkologe* 13: 109-117
15. **Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, Rube C, Rube Chr (2010)** The impact of individual in vivo repair of DNA Double-Strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head and neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 2010.
16. **Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF (1997)** Hypersensitivity of ataxia-telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat Biol* 72: 271-283
17. **Furuta T, Takemura H, Liao Z-Y, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM (2003)** Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induces by mammalian topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278: 20303-20312
18. **Goodhead DT (1994)** Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damaged in DNA. *Int. J. Radiat Biol* 65: 7-17
19. **Hall E (ed) (2000)** *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia USA
20. **Hansen JC (2002)** Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31: 361-392
21. **Herrmann T, Baumann M, Dörr W (eds) (2006)** *Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig*. Urban und Fischer
22. **Hewitson TD, Bisucci T, Darby IA (2006)** Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 326: 227-234.
23. **Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004)** Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA doublestrand breaks. *Nature* 432: 406-411
24. **Jakob B, Scholz M, Taucher-Scholz G (2003)** Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiation Research* 159: 676-684
25. **Khanna K, Jackson S (2001)** DNA double-strand breaks: signaling, repair, cancer connection. *Nature Genetics* 27: 247-254
26. **Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008)** γ -H2AX in recognition and signalling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36: 5678-5694

27. **Lee S, Cavallo L, Griffith J (1997)** Human p53 binds holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* 272: 7532-7539
28. **Löbrich M, Kühne M, Wetzel J, Rothkamm K (2000)** Joining of correct and incorrect DNA double-strandbreak ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes. Cancer* 27: 59-68
29. **Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M (2005)** In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Volume 102 25: 8984-8989
30. **Löbrich M, Kiefer J (2006)** Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 118: 2652-2656
31. **Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA (2010)** γ -H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair – Strengths, limitations and optimization. *Cell cycle* 9: 662-69
32. **Luger K (2003)** Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 13: 127-135
33. **Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002)** Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* 108: 781-794
34. **Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL (1989)** H2AX. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Research* 17: 9113-9126
35. **McElhinny SAN, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000)** Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol* 20: 2996-3003
36. **McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C (2001)** The use of DNA double-strand-break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 1180-1187
37. **Mersfelder EL, Parthun MR (2006)** The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research* 34: 2653-2662
38. **National Comprehensive Cancer Network (2010):** Head and Neck, Internetseite Stand 2010, http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/head-and-neck.pdf
39. **Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000)** Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* 20: 2996-3003
40. **O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Sperling K, Jeggo PA, Concannon P (2001)** DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8: 1175-1185

41. **Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A (2003)** Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 81: 123-129
42. **Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett, CF, Lehmann AR, Jackson SP (1999)** Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.* 19: 699-702
43. **Riballo E, Doherty AJ, Dai Y, Stiff T, Oettinger MA, Jeggo PA (2001)** Cellular and biochemical impact of a mutation in DNA ligase IV conferring clinical radiosensitivity. *J. Biol. Chem.* 276: 31124-31132
44. **Richardson C, Jasin M (2000)** Coupled Homologous and Nonhomologous Repair of a Double-Strand Break Preserves Genomic Integrity in Mammalian Cells *Mol Cell Biol* 20: 9068-9075
45. **Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998)** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868
46. **Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999)** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo *J Cell Biol* 146(5): 905-916
47. **Romm H, Oestreicher U, Stephan G (2005)** Welche Möglichkeiten bietet die biologische Dosimetrie für den beruflichen Strahlenschutz? *StrahlenschutzPraxis* 1: 37-42
48. **Rosenthal DI, Trotti A (2009)** Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 19: 29-34
49. **Rothkamm K, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2001)** Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 61: 3886-93
50. **Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003)** Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715
51. **Rothkamm K, Löbrich M (2003)** Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5057-5062
52. **Rübe CE, Dong XD, Kühne M, Fricke A, Kästner L, Lipp P, Rübe C (2008a)** DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72: 1180-1187
53. **Rübe CE, Grudzinski S, Kuhne M, Dong X, Rief N, Lobrich M, Rube C (2008b)** DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14(20): 6546-6555

54. **Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rübe C (2010)** DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify at risk for high-grade toxicities, *Int.J.Radiation Oncology Biol Phys* Vol 78 No 2: 359-369
55. **Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panuytin IG, Bonner W (2002)** Quantitative detection of 125Idu-induced DNA double strand breaks with H2AX antibody. *Radiat Res* 158: 486-492
56. **Smith GCM, Jackson SP (1999)** The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13: 916-934
57. **Smith J, Riballo E, Kysela B, Baldeyron C, Manolis K, Masson C, Lieber MR, Papadopoulo D, Jeggo PA (2003)** Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Res* 31: 2157-2167
58. **Sonis ST (2007)** Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncology* 5: 3-11
59. **Steel G (ed) (2002)** *Basic Clinical Radiobiology*. Hodder Arnold
60. **Stephan G, Oestreicher U, Romm H (2007)** Biological Dosimetry In: *Chromosomal Alterations - Methods, Results and Importance in Human Health*, Obe G, Vijayalaxmi (eds), Springer Verlag, Heidelberg: 341-349
61. **Sugawara N, Ira G, Haber JE (2000)** DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *MolCellBiol* 20(14): 5300-9
62. **Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998)** Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17: 5497-5508
63. **Taylor AM, Groom A, Byrd PJ (2004)** Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) its clinical presentation and molecular basis. *DNARepair (Amst)* 3: 1219-1225
64. **Thompson LH, Schild D (1999)** The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochemie* 81: 87-105
65. **Trotti A, Bellm LA, Epstein JB (2003)** Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 66: 253-262
66. **Valerie K, Povrik L (2003)** Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair; *Oncogene* 22: 5792-5812
67. **Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001)** Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implication for doublestrand break repair. *Nature* 412: 607-614

68. **Ward JF, Evans JW, Limoli CL, Calabro-Jones PM (1987)** Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br. J. Cancer* 55: Suppl. VIII 105-112
69. **Weber A, Schmid KW, Tannapfel A, Wittekind C (2010)** Neuerungen der TNM-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumoren. *Der Pathologe* 31 (5): 333-338.
70. **Werbrouck J, Duprez F, De Neve W, Thierens H (2001)** Lack of correlation between γ -H2AX foci kinetics in lymphocytes and the severity of acute normal tissue reactions during IMRT treatment for head and neck cancer. *International Journal Radiat. Biol.*, Vol. 87: 46-56
71. **West MH, Bonner WM (1980)** Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19: 3238-3245
72. **Whitaker SJ, Powell SN, McMillan TJ (1991)** Molecular assays of radiation-induced DNA damage. *European journal of cancer* 27: 922-928
73. **Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001)** Human DNA repair genes. *Science* 291: 1284-1289

8. Publikationen und Danksagung

Fleckenstein J, Kühne M, Seegmüller K, Derschang S, Melchior P, Gräber S, Rube C, Rube Chr: The impact of individual in vivo repair of DNA Double-Strand breaks on oral mucositis in adjuvant radiotherapy of head and neck cancer. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics, 2010.

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rube und der Leiterin des Labors für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau PD Dr. med. C. E. Rube für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Fleckenstein für die Überlassung des Promotionsthemas und die hervorragende Betreuung recht herzlich bedanken. Seine Anregungen, Denkanstöße, Diskussionsbereitschaft sowie seine unermüdliche Motivation und Unterstützung auch während schwierigen Phasen haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. rer. nat. Martin Kühne für die Mitbetreuung in der Anfangsphase der Arbeit und Frau Daniela Ludwig für die Unterstützung im Labor.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Dipl.-Math. Stefan Gräber als Leiter des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Durchsicht meiner statistischen Analyse.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Katharina Seegmüller für die Motivation, Hilfestellung und stets gute Zusammenarbeit beim praktischen Teil der Arbeit bedanken.

Der wohl größte Dank gilt meiner Familie. Danke für das Ermöglichen des Studiums und die andauernde Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens. Ich danke außerdem meinem Freund Henning Lang für seine großartige Unterstützung.