

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. C. Rube

**Die Bedeutung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur als
prädisponierender Faktor für Tumorerkrankungen und Strahlentoxizität
im Kindesalter**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

Vorgelegt von: Ruth Schneider
geb. am 05.02.1984 in Trier

Tag der Promotion:

Dekan:

Prüfungsvorsitz:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

Meiner Familie

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Summary	1
2. Einleitung	4
2.1 DNA-Doppelstrangbrüche	4
2.2 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	6
2.2.1 Das Nicht-Homologe Endjoining.....	7
2.2.2 Die Homologe Rekombination.....	8
2.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mithilfe der γ-H2AX- Immunfluoreszenz-Mikroskopie	9
2.4 Maligne Erkrankungen im Kindesalter	11
2.4.1 Epidemiologie.....	11
2.4.2 Ätiologie.....	14
2.4.3 Therapie.....	16
2.4.4 Prognose	18
2.5 Tumor-Prädisposition infolge defizienter DNA-Reparatur	20
2.5.1 Ataxia telangiectasia.....	21
2.5.2 Nijmegen breakage Syndrom	22
2.5.3 Fanconi-Anämie	23
2.5.4 Turcot-Syndrom	25
2.5.5 Beckwith-Wiedemann-Syndrom	25
2.6 Strahlentherapie: Früh- und Spättoxizitäten	27
2.7 Fragestellung und Ziel der Pilotstudie	30
3. Material und Methoden	32
3.1 Aufbau der Studie	32
3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien	32
3.1.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	33
3.2 Versuchsprotokoll	34
3.2.1 Materialien und Geräte.....	34
3.2.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Antikörper.....	35
3.2.2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	35
3.2.2.2 Antikörper.....	35
3.2.3 Röntgenbestrahlung.....	35

3.2.3.1 Vorbereitung	35
3.2.3.2 Bestrahlung der Proben	36
3.2.4 γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung.....	36
3.2.5 Auswertung der γ H2AX-Foci und statistische Methoden.....	38
3.3 Erfassung der strahleninduzierten Normalgewebstoxizität bei therapeutisch bestrahlten Kindern mittels der RTOG/EORTC-Kriterien	39
4. Ergebnisse	41
4.1 Probanden	41
4.2 Untersuchung der DNA-Doppelstrang-Reparaturkapazität mittels.....	46
γ-H2AX-Immunfluoreszenz	46
4.2.1 Statistische Auswertung	46
4.3 Auffällige Patienten	52
4.4 Korrelation der strahleninduzierten Normalgewebstoxizität mit der individuellen DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität	54
5. Diskussion	58
5.1 Bedeutung der eingeschränkten DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-fähigkeit für die Strahlentoxizität im Kindesalter	58
5.2 Bedeutung der eingeschränkten DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur-fähigkeit für die Tumorentstehung im Kindesalter	59
5.3 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der γH2AX-Foci	63
5.3.1 γ H2AX-Hintergrund-Fluoreszenz	63
5.4 Wertigkeit der γH2AX-Immunfluoreszenz als Marker für DNA-Doppel- strangbrüche	64
5.5 Wertigkeit der γH2AX-Immunfluoreszenz als prädiktiver Test für die klinische Radiosensitivität	66
5.6 Weiterführende Studien – Ausblick	67
6. Literaturverzeichnis.....	69
Publikation	88
Danksagung.....	89
Lebenslauf	90

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia mutated and RAD3-related</i>
ATLD	<i>Ataxia telangiectasia-like disorder</i>
53BP1	<i>p53-binding protein</i>
BRCA	<i>Breast cancer (gene)</i>
CT	Computertomographie
d	<i>day</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNA-PK _{CS}	katalytische Untereinheit der DNA-Proteinkinase (<i>catalytic subunit</i>)
DSB	DNA-Doppelstrangbruch, DNA-Doppelstrangbrüche, <i>DNA double-strand break, DNA double-strand breaks</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis, 1Gy = 1 Joule/kg)
h	<i>hour</i>
hMLH1	humanes MutL Homolog 1
HNPCC	<i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>
hPMS1+2	humane postmeiotische Segregation 1+2
HR	Homologe Rekombination
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICCC-3	<i>International Classification of Childhood Cancer, Third Edition</i>
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
kDa	Kilo Dalton
KiKK	Epidemiologische Studie zu Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken
KiSS	Epidemiologische Studie zu kindlichen Leukämien und Expositionen um hochfrequente Sendestationen
KoKi	Kontrollkinder
kV	Kilovolt
LESS	<i>Late Effects Surveillance System</i>

Mdc1	<i>Mediator of DNA damage-checkpoint 1</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
ml	Milliliter
MMR	Mismatch-Reparatur
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-NBS1-Komplex
MSH	mutS homolog
MV	Megavolt
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i> = Nibrin
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i> (nicht homologe End-zu-End-Verbindung)
NS	Normalserum von der Ziege
p53	Tumorsuppressor-Gen 53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
RiSK	Register zur Erfassung radiogener Spätfolgen bei Kindern und Jugendlichen
RPMI	Nährmedium (Formulierung: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RS-SCID	<i>Radiation-sensitive severe combined immunodeficiency</i>
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
SE	<i>Standard error</i> (Standardfehler)
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
TuKi	Tumorkinder
V(D)J	<i>Variable (diversity) joining</i> (Immunglobulingenfragmente)
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	<i>X-ray-complementing Chinese hamster gene 4</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung / Summary

Maligne Erkrankungen sind, trotz intensiver Forschung und Verbesserungen der Therapiekonzepte in den letzten Jahrzehnten, die zweithäufigste Todesursache bei Kindern jenseits des Säuglingsalters. Die Ursachen für Krebserkrankungen bei Kindern sind noch weitgehend ungeklärt. Das individuelle Krebsrisiko wird neben Umweltfaktoren, die im Kindesalter von eher untergeordneter Bedeutung sind, von der individuellen genetischen Prädisposition beeinflusst. Seltene hereditäre Erkrankungen, bei denen Defizienzen in DNA-Reparaturmechanismen bestehen und die mit einem deutlich erhöhten Malignomrisiko einhergehen, geben Hinweise auf die grundlegende Bedeutung der DNA-Reparatur für die Krebsentstehung. Eine gestörte DNA-Reparatur führt zu genomischer Instabilität und stellt somit einen bedeutenden Risikofaktor für die Tumorentstehung bereits im Kindesalter dar. Zu den wichtigsten DNA-Reparaturmechanismen gehört die DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur, da nicht oder unzureichend reparierte DSB zur Entartung der Zelle oder zum Zelltod führen können. In der vorliegenden Pilotstudie wurde die DSB-Reparaturfähigkeit von tumorkranken und gesunden Kindern mittels der γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Methode untersucht, um Kinder mit DSB-Reparaturdefizienzen zu identifizieren und mögliche Zusammenhänge zwischen Tumorerkrankung, therapieassoziierten Nebenwirkungen und defizienter DSB-Reparatur zu eruieren.

Die DSB-Reparaturkapazität von Kindern mit vorwiegend soliden Tumoren wurde mit einer altersadaptierten Gruppe gesunder Kinder verglichen. Hierzu wurden Blutproben röntgenbestrahlt, zu definierten Reparaturzeitpunkten aufgearbeitet und γ -H2AX-Foci als Korrelat für unreparierte DSB in Lymphozytenkernen ausgezählt. Die DSB-Reparaturkapazität der krebserkrankten Kinder wurde mit Strahlen- und Chemotherapie-assoziierten Toxizitäten korreliert. Die klinische Einteilung der radiotherapierten Kinder erfolgte mittels der RTOG/EORTC-Klassifikation (*Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer*).

Während alle gesunden Kinder der Kontrollgruppe eine effiziente DSB-Reparaturkapazität aufwiesen, zeigten vier Kinder der Tumorgruppe eine beeinträchtigte DSB-Reparatur. Zwei dieser Kinder entwickelten lebensbedrohliche Normalgewebstoxizitäten. Darüber hinaus konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren DSB-Reparaturkapazitäten der beiden Gruppen beobachtet werden. Die Kinder der Tumorgruppe reparierten im Mittel schlechter als die gesunden Kinder.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie geben Hinweise darauf, dass eine eingeschränkte DSB-Reparaturfähigkeit für Malignome im Kindesalter und für ausgeprägte Normalgewebstoxizitäten prädisponiert. Die Analyse von Blutproben mittels der γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Methode ermöglicht es, Patienten mit DSB-Reparaturdefizienzen zu erkennen und damit Kinder mit hochgradigem Risiko für Normalgewebstoxizitäten zu identifizieren.

DNA double-strand break repair as a predisposing factor for malignancies and radiation toxicity in childhood

Despite intensive research and the improvements of therapeutical concepts during the last decades, malignant diseases are the second most frequent cause of death among children above the age of infancy. The causes of childhood cancer are still largely unsolved. Besides environmental factors, which are of subordinate importance during childhood, the individual cancer risk is influenced by the individual genetic predisposition. Rare hereditary diseases, which show deficiencies in DNA repair mechanisms and are attended by a significantly higher risk of malignancy, give some indication of the importance of DNA-repair for carcinogenesis. An impaired DNA repair leads to genomic instability and therefore represents a relevant risk factor for the development of tumors in childhood. Among the most important DNA-repair mechanisms is the DNA double-strand break (DSB) repair, because not or insufficiently repaired DSB can lead to the degeneration or the death of a cell. This pilot study examines the ability for DSB repair of children with and without tumors by using γ -H2AX immunofluorescence. Thus, children with DSB repair deficiencies can be identified and a possible connection between tumors, treatment-related side-effects and deficient DSB repair can be determined.

The DSB repair capacity of children with predominantly solid tumors was compared with an age-adjusted group of healthy children. For this, blood samples were x-rayed, examined at defined points of repair time, and γ -H2AX foci were counted as a correlate for unrepaired DSB in lymphocytes. The DSB repair capacity of cancer children was correlated with radio- and chemotherapy-related toxicities. The clinical classification of those children treated with radiotherapy, was made according to the RTOG/EORTC classification (Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer).

While all control children had an efficient DSB repair capacity, four children with tumors showed an impaired DSB repair. Two children developed life-threatening normal-tissue toxicities. Moreover, a significant difference between the average DSB repair capacities of both groups could be observed. The tumor group averaged lower in DSB repair than the control group.

The results of this pilot study indicate, that an impaired DSB repair function may predispose to childhood cancer and to serious normal-tissue toxicities. The analysis of blood samples using γ -H2AX immunofluorescence allows to find out patients with DSB repair deficiencies and thus to identify children with a high-grade risk for normal-tissue toxicities.

2. Einleitung

2.1 DNA-Doppelstrangbrüche

Die Erhaltung der Integrität des Genoms ist eine Grundvoraussetzung für die Gesundheit von Lebewesen. Die DNA enthält die genetische Information eines Organismus. Ihre Unversehrtheit ist jedoch ständig durch verschiedene endogene und exogene Faktoren bedroht (Abb. 1). Von den vielen unterschiedlichen Schäden, die am DNA-Molekül induziert werden können, wie Einzelstrangbrüche und DSB, Vernetzungen (Crosslinks), Basenschäden oder Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, gehören die DSB zu den schwersten Läsionen. Nicht oder falsch reparierte DSB bedrohen die genetische Stabilität und das Zellüberleben (Ferguson DO & Alt FW 2001, Jackson SP 2002, Mahaney BL et al. 2009): Es kann zu intra- oder interchromosomalen Veränderungen wie Deletionen, Translokationen und Fusionen kommen. Dies kann zum Verlust von genetischem Material, zu Veränderungen der zellulären Funktion, zum Zelltod oder zur malignen Transformation der Zelle und damit zur Krebsentstehung führen (Chen P et al. 2008, Li D et al. 2009, Shrivastav M et al. 2008, Shiloh Y 2003, Willers H et al. 2004).

Zu den endogenen Ursachen für DSB gehören freie Radikale, die als Nebenprodukte im Zellstoffwechsel gebildet werden (Kryston TB et al. 2011), zudem treten DSB durch Fehler bei der DNA-Replikation auf. Physiologisch notwendig sind DSB während der V(D)J-Rekombination (variable diversity joining) in B- und T-Zellen und bei der Meiose (Jackson SP 2001 und 2002, Khanna KK & Jackson SP 2001, Rush JS et al. 2004). DSB können zudem in großem Ausmaß entstehen, wenn die Zelle oder der Organismus äußeren Einflüssen wie ionisierender Strahlung, DNA-schädigenden Chemikalien oder Zytostatika ausgesetzt ist (Dronkert ML & Kanaar R 2001, Staszewski O et al. 2008).

Zu den Chemotherapeutika die DSB erzeugen können, gehören Radiomimetika wie Bleomycin (Takeshita M et al. 1978), Anthracycline wie Doxorubicin (Hortobágyi GN 1997), oder Topomeraseinhibitoren wie Etoposid (Burden DA et al. 1996).

Die Exposition des Menschen gegenüber ionisierender Strahlung setzt sich aus der natürlichen und der zivilisatorischen Strahlenexposition zusammen. Die zivilisatorische Strahlenexposition in Deutschland besteht vor allem aus diagnostischen (z.B. Computertomographie) und therapeutischen (z.B. Radiotherapie) Massnahmen in der Medizin. Strahlenexpositionen durch kerntechnische Anlagen, Reaktorunfälle oder Kernwaffenversuche tragen in Deutschland in nur geringem Maße zur zivilisatorischen

Strahlenexposition bei. Zu den natürlichen Strahlenquellen gehören die kosmische Strahlung, die terrestrische Strahlung und die Inhalation des radioaktiven Edelgases Radon und seiner Folgeprodukte sowie die Aufnahme von Radionukliden über die Nahrung. Je nach Wohnort und Lebensgewohnheiten beträgt die natürliche Strahlenexposition im Jahr für den Einzelnen zwischen 1 und 10 Millisievert (Bundesamt für Strahlenschutz, Jahresbericht 2009).

Ionisierende Strahlung kann durch direkte Ionisation oder indirekt über entstehende Hydroxylradikale zu DNA-Schäden führen. Ein DSB besteht aus zwei Einzelstrangbrüchen von gegenüberliegenden DNA-Einzelsträngen, die durch Basenschäden oder Reaktionen mit der Desoxyribose des Zucker-Phosphat-Rückgrat entstehen und etwa 10-20 Basenpaare voneinander entfernt sind (Jackson SP 2002, Mahaney BL et al. 2009). Die durch ionisierende Strahlung entstehenden DSB können in der Mehrzahl nicht durch einen einfachen Ligationsschritt zusammengefügt werden, da meist komplexe und multiple Schäden entstehen. Es kann zu überhängenden 3'- und 5'-Enden oder zum Basenverlust kommen und es können nicht ligierbare Enden wie 3'-Phosphat- oder 3'-Phosphoglycolat-Gruppen entstehen (Mahaney BL et al. 2009).

Um den ständigen Angriffen auf das DNA-Molekül widerstehen zu können, haben Organismen biochemische Vorgänge entwickelt, um DNA-Schäden zu entfernen und so die Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Wie in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt, wird nach der Entdeckung eines DSB durch Sensorproteine eine signalverstärkende Kaskade ausgelöst, Transducer verstärken das Signal und letztlich werden Effektorproteine aktiviert, was in einer DNA-Schadensantwort endet. Im günstigsten Fall kann mit der DSB-Reparatur begonnen werden, in manchen Fällen muss die Zelle im Zellzyklus angehalten werden und bei besonders schwerwiegenden DNA-Schäden bleibt nur der programmierte Zelltod, die Apoptose (Khanna KK & Jackson SP 2001).

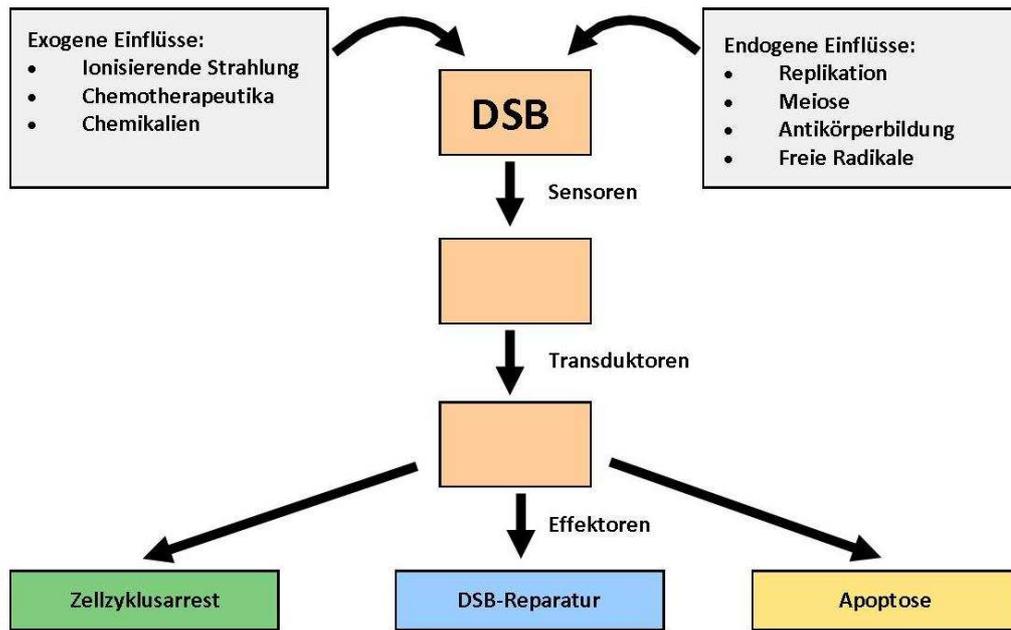


Abb. 1.: Signalkaskade nach DSB (nach Khanna KK & Jackson SP 2001).

2.2 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Für die DSB-Reparatur des Menschen stehen zwei Reparaturmechanismen zur Verfügung, das Nicht-Homologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) (Abb. 2). Spezifische Proteine können DSB detektieren, die Zelle in der Zellzyklusphase arretieren und einen der beiden DSB-Reparaturmechanismen aktivieren (Shrivastav M et al. 2008). Die HR kann nur nach der Replikation, wenn bereits ein zweites identisches Chromosom als Vorlage zur Verfügung steht, also in der S- und der frühen G2-Phase angewandt werden (Christmann M et al. 2003). Ansonsten kommt der Reparaturweg der nicht-homologen End-zu-End-Verbindung, zum Einsatz. Diese kann in allen Zellzyklusphasen ablaufen (Rothkamm K et al. 2003), da die freien DNA-Enden miteinander verknüpft werden. Dadurch kann es jedoch auch zur Veränderung oder zum Verlust genetischer Information kommen (Hoeijmakers JH 2001). Frühzeitig wird die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) aktiviert (Abb. 2), die über p53 und p21 den Zellzyklus anhalten kann (Hoeijmakers JH 2001). ATM und weitere Kinasen wie ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3-related*) und die DNA-PKcs, eine Untereinheit der DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), phosphorylieren das Histon

H2AX. Hierdurch kann der DNA-Schaden von den Reparaturproteinen besser erkannt werden (Paull TT et al. 2000, Hoeijmakers JH 2001).

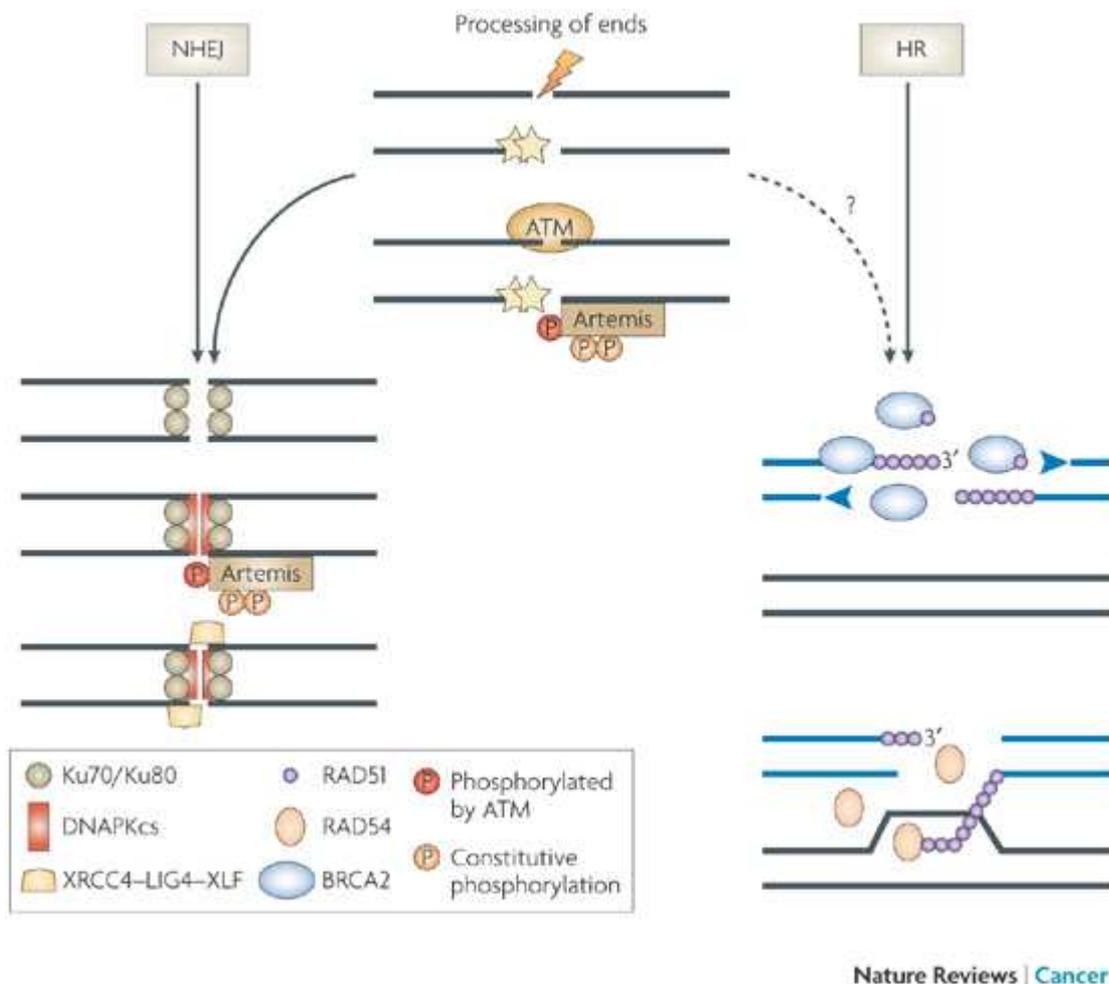


Abb. 2: NHEJ und HR.
 Quelle: Löbrich M & Jeggo PA 2007

2.2.1 Das Nicht-Homologe Endjoining

Dieser Reparaturweg wird in höheren Eukaryoten hauptsächlich verwendet, da er während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung steht und keine homologe DNA als Vorlage benötigt. Das NHEJ ist in der Lage, auch bei komplizierten DSB, wie sie durch ionisierende Strahlung oder Sauerstoffradikale entstehen, die strukturelle Stabilität des Genoms zu gewährleisten (Lieber MR 2008). Die DNA-Enden eines DSB werden direkt oder nach dem Prozessieren wieder zusammengefügt. Es wird zuvor keine Sequenzhomologie geprüft, somit ist dieser Reparaturweg fehleranfällig, es kann zu Insertionen und Deletionen kommen (Hoeijmakers JH 2001, Willers H et al. 2004).

Wie in Abbildung 2 zu sehen, bindet an die freien DNA-Enden zunächst ein Heterodimer, ein Proteinkomplex aus Ku70 und Ku80, um deren Abbau zu verhindern (Löbrich M & Jeggo PA 2007, Jeggo P 2010). Dieser bildet im zweiten Schritt einen Komplex mit der DNA-PKcs, der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (Jeggo PA 1998, Jackson SP 2002). Die DNA-PKcs ist ein großes Protein mit einer Kinase-Domäne am C-terminalen Ende. Die Kinaseaktivität wird durch die Bindung an den Ku-Komplex aktiviert (Jeggo P 2010). Die Rolle der DNA-PK-Kinase-Aktivität ist derzeit noch nicht vollständig geklärt, sie unterstützt wahrscheinlich das Prozessieren der DNA-Enden (Jeggo P 2010). Es wurde beschrieben, dass die DNA-PK DNA-bindende Proteine wie XRCC4 (*X-ray-complementing Chinese hamster gene 4*), DNA-Ligase IV, Artemis, p53 und verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und aktiviert (Weterings E & van Gent DC 2004). Durch das Protein Artemis und die DNA-PKcs können nicht direkt ligierbare Bruchenden zuvor prozessiert werden. Ein Komplex aus XLF (*XRCC4-like factor*), XRCC4 und DNA Ligase IV verknüpft die freien Enden. Die Polymerasen μ und λ können Lücken in der Sequenz auffüllen (Hoeijmakers JH 2001, Jeggo P 2010, Khanna KK & Jackson SP 2001, Lieber MR 2008).

2.2.2 Die Homologe Rekombination

Die HR benötigt homologe DNA als Reparaturvorlage. Es kommt zur Interaktion des durchtrennten DNA-Moleküls mit der homologen Sequenz des Partnerchromosoms (Hoeijmakers JH 2001). Hierzu bereitet die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des MRE11-RAD50-NBS1-Proteinkomplexes (MRN-Komplex) 3'-Überhänge an den Bruchstellen vor (Yang YG et al. 2006). Das Protein RPA bindet die Einzelstränge und wird durch die Rekrutierung von den Proteinen RAD52, RAD54 und dem Heterodimer RAD55/RAD57 gegen RAD51 ausgetauscht (Sugiyama T & Kowalczykowski SC 2002). RAD 51 bildet mithilfe weiterer Proteine (RAD51B, C und D und XRCC2, XRCC3) ein Nukleoproteinfilament. BRCA2 (*breast cancer protein 2*) stimuliert die Bildung des RAD 51-Einzelstrang-Filaments. Dieses führt zum Erkennen des homologen DNA-Abschnitts, zur Stranginvasion und zur Ausbildung einer Heteroduplex-DNA, einer sogenannten Holliday Junction. Es folgt die DNA-Synthese, die Ligation der DNA-Enden und die Auflösung der Holliday Junction durch Resolvasen (Helleday T et al. 2007). Bei dieser Form der DSB-Reparatur entstehen in der Regel keine Fehler, da homologe Sequenzen als Matrize dienen.

2.3 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mithilfe der γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Methode basiert auf der Detektierung des spezifischen Histonproteins γ H2AX mittels einer Immunfluoreszenzmarkierung. Das Histon H2AX, eine Variante des H2A-Histonproteins, ist im Chromatingerüst von eukaryotischen Zellen universell vorhanden (Rogakou EP et al. 2000). Die übrigen Untergruppen von H2A sind H2A1, H2A2 und H2AZ. H2AX macht zwischen 2 und 25 % der H2A-Histonfamilie aus (Rogakou EP et al. 1998). Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet. Dieses wird in der Schadensantwort der Zelle auf DNA-DSB im Chromatingerüst der DNA gebildet: Nach einem DSB wird H2AX am carboxyterminalen Ser-Gln-Glu-Motiv der Base Serin 139 phosphoryliert. Die Phosphorylierung kann durch drei Proteinkinasen vermittelt werden: durch ATM (Burma S et al. 2001, Fernandez-Capetillo O et al. 2002), ATR (Ward IM & Chen J 2001) oder durch die DNA-PK (Park EJ et al. 2003, Stiff T et al. 2004). Die Reaktion ist eine frühe Schadensantwort, sie tritt etwa drei Minuten nach der Bestrahlung von Zellen auf (Rogakou EP et al. 1998 und 2000, Foster ER & Downs JA 2005). Die Phosphorylierung von H2AX beginnt in der direkten Umgebung des Bruchs und breitet sich dann durch Rückkopplungsereignisse aus, wodurch die H2AX-Moleküle bis in etwa zwei Megabasenpaaren Entfernung vom DSB phosphoryliert werden (Rogakou EP et al. 1999). Die Entstehung dieser γ H2AX-Ansammlung erreicht nach 10 bis 30 Minuten ihr Maximum (Redon C et al. 2002). Mittels Pulsfeldgelelektrophorese wurde gezeigt, dass γ -H2AX proportional im Verhältnis zur verwendeten Strahlendosis entsteht (Rogakou EP et al. 1998). γ H2AX kolokalisiert mit DNA-Reparaturproteinen wie 53BP1 (*p53-binding protein*), RAD51, RAD50, BRCA1 (*breast cancer protein 1*), dem MRN-Komplex und Mdc1 (*mediator of DNA damage-checkpoint 1*) (Bekker-Jensen S et al. 2006, Celeste A et al. 2003, Kobayashi J et al. 2009, Paull TT et al. 2000).

Die phosphorylierten H2AX-Proteine können mit spezifisch bindenden Antikörpern markiert werden. In Kombination mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern können DSB mittels Immunfluoreszenzmikroskopie als zählbare Foci visualisiert und quantifiziert werden (Burma S et al. 2001, Löbrich M & Kiefer J 2006). Jeder Focus enthält Hunderte von γ H2AX-Molekülen. Durch die Quantifizierung der γ H2AX-Foci zu festgelegten Zeitpunkten nach einer definierten Strahlenexposition von Zellen kann die Abnahmekinetik der Foci erfasst werden und somit unter bestimmten Voraussetzungen auf die DNA-DSB-Reparaturkapazität

der untersuchten Zellen geschlossen werden (Löbrich M et al. 2010, Sedelnikova OA et al. 2002 und 2003, Rothkamm K & Löbrich M 2003). Somit stellt die Quantifizierung von γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzmikroskopie eine sensitive Untersuchung dar, die eine DSB-Reparatur nach der Einwirkung physiologischer Strahlendosen überprüfen kann (Löbrich M et al. 2010, Rothkamm K & Löbrich M 2003).

In früheren experimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden mit der γ H2AX-Immunfluoreszenz und der γ H2AX-Immunhistologie hochsensitive Verfahren zum in vivo-Nachweis von strahleninduzierten DSB bei Lymphozyten im Blut und in verschiedenen Organgeweben von Mäusen etabliert. Unabhängig vom Zell- oder Gewebetyp einer Maus konnten jeweils die gleichen γ H2AX-Foci-Abnahmekinetiken gezeigt werden. Es wurden - genetisch bedingt unterschiedlich strahlenempfindliche - Mausstämme in vivo bestrahlt, Gewebe und Blut entnommen, fluoreszenzgefärbt und die γ H2AX-Foci am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Zahl der induzierten DSB pro Zellkern nahm linear mit der Bestrahlungsdosis zu. Die Reparaturdefekte waren in Organgeweben und Lymphozyten gleichermaßen nachweisbar, sodass anhand leicht zugänglicher Lymphozytenuntersuchungen auf die Reparaturkinetiken der Organe geschlossen werden kann (Rübe CE et al. 2008a und 2008b). Die γ H2AX-Foci-Analyse gibt präzise Information über die genetisch bedingte DNA-DSB-Reparaturkapazität eines Individuums (Löbrich M et al. 2005). Löbrich et al. (2005) konnten mithilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenz einen eindeutigen DSB-Reparaturdefekt bei einem Patienten nachweisen, der zuvor unerwartet schwerwiegende Nebenwirkungen nach einer Radiotherapie erlitten hatte. Dies zeigt die Nachweismöglichkeit des direkten Zusammenhangs einer defizienten DNA-DSB-Reparaturkapazität und eines ausgeprägtes Risikos für schwerwiegende Normalgewebstoxizitäten aufgrund erhöhter Radiosensitivität.

Als direkte Vorexperimente unserer Arbeitsgruppe für diese Pilotstudie wurde Blut von verschiedenen strahlenempfindlichen Mausstämmen ex vivo zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der in vivo-Studie (Rübe CE et al. 2008b) bestrahlt. Untersucht wurde das Blut von normal reparierenden C57BL6-Mäusen, von BALB/c-Mäusen mit leicht erhöhter Strahlenempfindlichkeit und von heterozygoten AT-Mäusen, um zu prüfen, ob auch leichte Reparaturdefekte ex vivo entdeckt werden können. In den Ergebnissen zeigten sich keine Unterschiede zwischen der DSB-Reparatur innerhalb und außerhalb des Körpers, die Reparaturunterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen waren in gleicher Weise wie in vivo zu detektieren.

2.4 Maligne Erkrankungen im Kindesalter

2.4.1 Epidemiologie

Malignome im Kindesalter sind seltene Erkrankungen, die etwa 1 % aller Krebserkrankungen ausmachen. Dennoch sind sie in Industrieländern die Hauptursache für krankheitsbedingte Kindersterblichkeit (Buka I et al. 2007). Jährlich erkranken in Deutschland etwa 1800 Kinder unter 15 Jahren an einem Malignom, die Inzidenz beträgt damit 15 Fälle pro 100.000 Kinder in dieser Altersklasse. Die Wahrscheinlichkeit eines Neugeborenen, bis zu seinem 15. Lebensjahr an einer malignen Neoplasie zu erkranken, beträgt 0,2 %, so wird bei jedem 450. Kind bis zum 15. Lebensjahr eine bösartige Krebserkrankung diagnostiziert (Deutsches Kinderkrebsregister (DKKR), Jahresberichte 2006/07-2009).

Am häufigsten sind Leukämien mit 34 %, gefolgt von den Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) mit 23 % und den Lymphomen mit 12 % (Kaatsch P 2010). In absteigender Häufigkeit treten Tumoren des peripheren Nervensystems, Weichgewebstumoren, Nierentumoren, Knochentumoren, Keimzelltumoren, Retinoblastome, Karzinome, Lebertumoren und andere Tumoren auf.

Die Abbildung 3 zeigt die relative Häufigkeit der 1998 bis 2007 gemeldeten Patienten unter 15 Jahren nach den häufigsten Diagnosegruppen (DKKR, Jahresbericht 2008). Die Tumorarten sind nach der *International Classification of Childhood Cancer, third edition* (ICCC-3), erstellt von einer Arbeitsgruppe der IARC (*International Agency for Research on Cancer*), eingeteilt (Steliarova-Foucher E et al. 2005a).

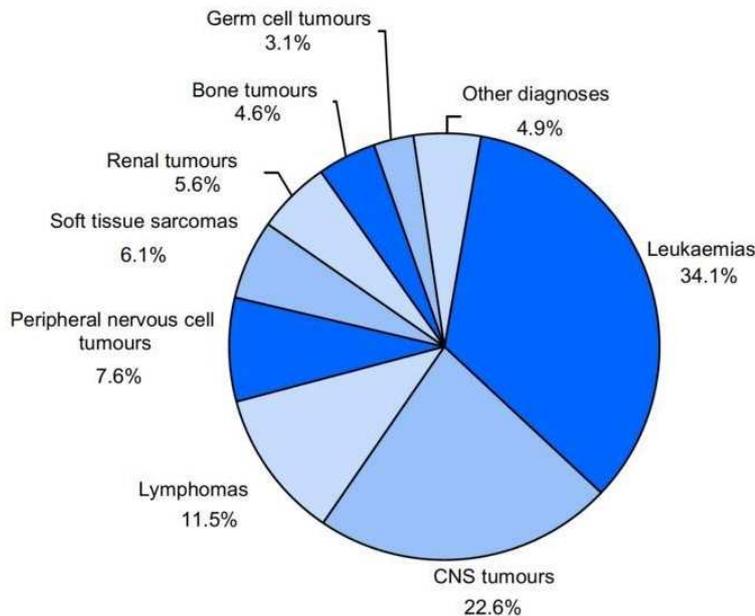


Abb. 3: Relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten unter 15 Jahren aus der deutschen Wohnbevölkerung nach den häufigsten ICCC-3 Diagnose-Hauptgruppen (1998-2007) (n=18.217)
 Quelle: DKKR, Jahresbericht 2008

Vergleicht man die relativen Häufigkeiten von Malignomen im Kindes- und Erwachsenenalter, so zeigen sich grundlegende Unterschiede: Im Kindesalter machen Leukämien und Lymphome fast die Hälfte aller Krebserkrankungen aus. Die meisten soliden Tumoren betreffen das ZNS. Weiterhin treten Sarkome des Weichgewebes und Knochens, sowie Nieren- und Keimzelltumoren auf. Das mittlere Erkrankungsalter ist von der Tumorart abhängig: Das Risiko für eine Krebserkrankung ist in den ersten fünf Lebensjahren etwa doppelt so hoch wie im späteren Kindesalter (Abb. 4). Dies weist auf eine frühe Entwicklung vieler kindlicher Tumoren hin wie bei den meisten embryonalen Tumoren, hierzu gehören beispielsweise das Neuro-, Retino-, Hepato- oder Nephroblastom. Diese Tumoren ähneln histologisch dem embryonalen Gewebe der entsprechenden Organanlagen. Die Diagnose wird meist vor dem vierten Lebensjahr gestellt, Neuro- und Retinoblastome haben ihren Altersgipfel bereits im ersten Lebensjahr. Im Jugendalter treten eher Osteosarkome oder andere Knochentumoren sowie Hodgkin-Lymphome auf. Karzinome, die im Erwachsenenalter mit 90 % die größte Diagnosegruppe stellen, machen im Kindesalter nur 1,6 % der malignen Erkrankungen aus (Fallzahlen von 1999-2008, DKKR).

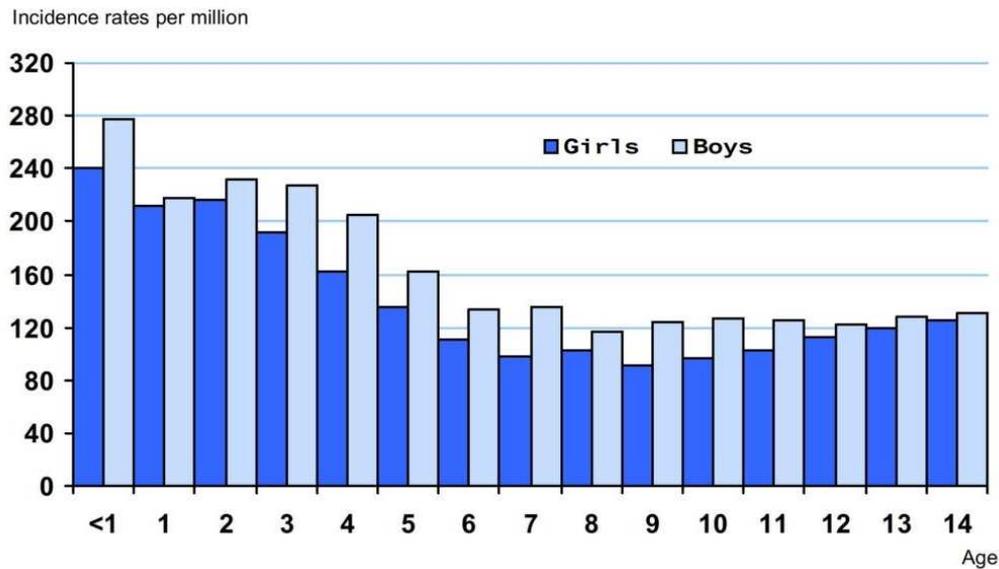


Abb. 4: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenzen für alle Malignome auf Basis des ICC3 der Patienten unter 15 Jahren aus der deutschen Wohnbevölkerung (1999-2008)
 Quelle: DKKR, Jahresbericht 2009

Jungen erkranken häufiger, das Inzidenzverhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt in jeder Altersgruppe 1,2:1 (Abb. 4).

Aussagekräftige Daten für Jugendliche zwischen 15 und 19 Jahren liegen bislang nur aus den USA vor (*surveillance, epidemiology and end results* (SEER), Howlader N et al. 2011): Die Inzidenzrate der Jugendlichen entspricht in etwa der der unter 5-Jährigen, das Diagnosespektrum ist jedoch ein anderes. Am häufigsten sind Lymphome und Keimzelltumoren, auch Karzinome sind häufiger als bei jüngeren Kindern, wobei in diesem Alter vor allem Schilddrüsenkarzinome auftreten. Ansonsten sind vorwiegend Leukämien, ZNS-Tumoren, Weichteiltumoren, maligne Melanome und Knochentumoren zu verzeichnen. Embryonale Tumoren gibt es in ihrer Primärmanifestation in diesem Alter praktisch nicht.

Nach Analyse des DKKR stieg die Inzidenz für Krebserkrankungen im Kindesalter jährlich signifikant um 0,8 % an (Abb. 5). Ursache des Anstiegs ist die verbesserte Meldung von ZNS-Tumoren und der signifikante Anstieg bei der lymphatischen Leukämie als häufigster Einzeldiagnose. Ein beträchtlicher Anteil der in ganz Europa sichtbaren Inzidenzsteigerung ist jedoch nicht nur mit verbesserten Meldesystemen zu erklären, sondern beschreibt einen wirklichen Anstieg der Krebserkrankungen im Kindesalter. Die Ursachen hierfür sind noch nicht vollständig erforscht: Unter anderem werden Veränderungen der Lebensgewohnheiten, Umweltfaktoren, die gestiegenen Möglichkeiten der Reproduktionsmedizin und die gesunkene Kindersterblichkeit dafür verantwortlich gemacht (Kaatsch P et al. 2006a, Spix C

et al. 2008, Steliarova-Foucher et al. 2005b). Dieser Anstieg ist bei den US-amerikanischen Daten in ähnlicher Weise zu sehen (Howlander N et al. 2011).

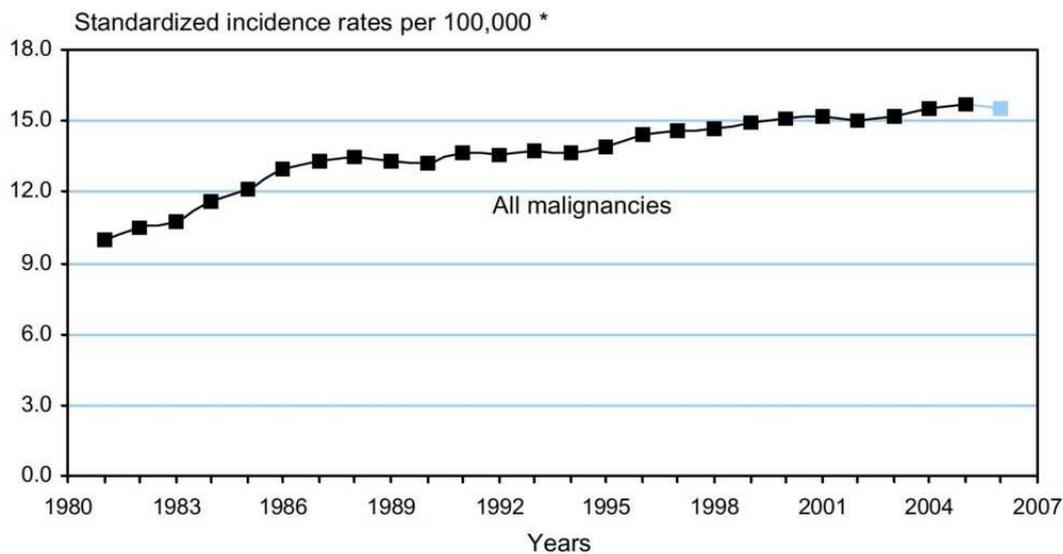


Abb. 5: Altersstandardisierte Inzidenzen für alle Malignome, Leukämien, ZNS-Tumoren und Neuroblastome der Patienten unter 15 Jahren in Westdeutschland ohne Berlin nach dem Jahr der Diagnosestellung. Geglättete Darstellung (gleitendes 3-Jahremittel)
Quelle: DKKR, Jahresbericht 2008

2.4.2 Ätiologie

Die Ätiologie maligner Erkrankungen im Kindesalter ist bislang trotz intensiver Forschung noch weitgehend ungeklärt.

Verschiedene ätiologische Aspekte exogener Art wie Umweltfaktoren, ionisierende und nichtionisierende Strahlung und Infektionen, sowie endogener Art, im Sinne genetischer Ursachen, werden diskutiert (Hammer GP et al. 2009, McKinney PA 2005, Pritchard-Jones K et al. 2006, Stiller CA 2004). Wichtige Risikofaktoren im Erwachsenenalter, wie etwa langjähriges Zigarettenrauchen, chronische Exposition von UV-Strahlung oder Toxinbelastungen am Arbeitsplatz sind bei Kindern von untergeordneter Bedeutung. Bestimmte Umwelttoxine, unter anderem Benzol, Pestizide oder Blei, die präkonzeptionell auf die Keimzellen der Eltern, intrapartal oder postpartal auf das Kind einwirken, sind als wichtige Risikofaktoren für Krebs bei Kindern beschrieben worden (Wigle DT et al. 2008). In einer anderen Untersuchung zeigten sich Zusammenhänge für die mütterliche Einnahme von Antibiotika kurz vor oder während der Schwangerschaft und das Auftreten einiger Tumorarten bei den Kindern (Kaatsch P et al. 2010). Der Anteil an kindlichen Malignomen,

der durch Umweltfaktoren verursacht wird, wird jedoch als sehr gering eingeschätzt, eine hohe Schätzung geht von 5-10 % der Malignome bei Kindern aus (Linnet MS et al. 2003). Es gibt derzeit nur wenige gesicherte Risikofaktoren; für Pestizide und viele Chemikalien reichen die Daten noch nicht aus.

Am intensivsten untersucht sind Ursachen und Risikofaktoren für Leukämien und ZNS-Tumoren. Sichere Risikofaktoren für die Leukämie sind Alkylantien, hohe Dosen ionisierender Strahlung und genetische Erkrankungen wie die Trisomie 21 (Fonatsch C 2010, Kaatsch P et al. 2006b). Zudem werden unzureichend entwickelte Immunsysteme (Greaves M et al. 2002), nichtionisierende Strahlung, Pestizide und andere Chemikalien diskutiert (Ahlborn A et al. 2000, Meinert R et al. 2000). Zwischen Wohlstand und Leukämieerkrankungsrate wurde eine starke Korrelation gezeigt (Spix C et al. 2008, Stiller CA 2004). Nach dem Ergebnis der KiKK-Studie (Epidemiologische Studie zu Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken) des DKKR nimmt für 0-4-jährige Kinder das Risiko an Leukämie zu erkranken zu, je näher ihr Wohnort an einem Kernkraftwerkstandort liegt (Kaatsch P et al. 2008). Nach der KiSS-Studie besteht kein Zusammenhang zwischen der Nähe des Wohnortes zu hochfrequenten Sendeeinrichtungen und Leukämie im Kindesalter (Merzenich H et al. 2008).

Ursachen für ZNS-Tumoren sind bestimmte genetische Syndrome und eine therapeutische Bestrahlung des Schädels (Schüz J & Kaatsch P 2002). Weiterhin werden Virusinfektionen als ätiologische Faktoren in der Entstehung von ZNS-Tumoren vermutet (Cobbs CS et al. 2002, Croul S et al. 2003, McNally RJ et al. 2002, Vilchez RA & Butel JS 2003). Die Entstehung kindlicher ZNS-Tumoren aufgrund frühkindlicher Infektionen konnte von einer jüngsten epidemiologischen Studie wiederum nicht unterstützt werden (Schmidt LS et al. 2010).

Lymphome können seltene Folge einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus sein; die sehr unterschiedlichen Inzidenzraten in verschiedenen ethnischen Gruppen weisen jedoch auf den bedeutenden Einfluss genetischer Faktoren hin (Stiller CA 2004).

Als wesentlichster exogener Risikofaktor für Malignome im Kindesalter gilt die ionisierende Strahlung. Durch sie entstehen DNA-Schäden, die durch spezifische Proteine der Zelle repariert werden müssen. Bei unzureichender Reparatur können Zellzyklus und -wachstum gestört werden, es können Mutationen entstehen, die zur Krebszelle und damit zum Entstehen eines Malignoms führen. Ionisierende Strahlung erhöht ab bestimmten Dosen das Risiko für Leukämien, ZNS-, Knochen- und Schilddrüsentumoren (Linnet MS et al. 2003). In einer aktuellen Studie zeigte sich das Kinderkrebsrisiko im Niedrigdosisbereich durch diagnostische

Strahlenbelastung nicht erhöht (Hammer GP et al. 2009). Auch für die präkonzeptionelle Exposition der Keimzellen wird kein erhöhtes Risiko angenommen (McKinney PA 2005). Für das erhöhte Krebsrisiko von Kindern nach Computertomographieuntersuchungen existieren bislang nur Hochrechnungen, aus denen ein niedriges, aber nicht zu vernachlässigendes Risiko geschlossen wird (Chodick G et al. 2007). Das Wissen zu strahleninduzierten Malignomen bei Kindern stammt von Überlebenden atomarer Katastrophen (Little MP 2009, Preston DL et al. 2008), von der früher vermehrt praktizierten Röntgendiagnostik in utero (Bithell JF & Stewart AM 1975) oder von der Radiotherapie benigner und maligner Erkrankungen (Neglia JP et al. 2001 und 2006, Sadetzki S et al. 2006). Auch die natürliche terrestrische Strahlung wurde als Risikofaktor für Krebs im Kindesalter verschiedentlich untersucht. Hierbei wurden einerseits erhöhte Raten von Leukämien (Raaschou-Nielsen O et al. 2008, Wakeford R et al. 2009) gezeigt, in anderen großen Studien wurden andererseits keine Hinweise für ein erhöhtes Krebsrisiko im Kindesalter durch terrestrische Strahlung gefunden (Zou J et al. 2005). Das Risiko, ein strahleninduziertes Malignom zu entwickeln ist bei Kindern etwa zehnfach höher als bei Erwachsenen; jüngere Kinder sind strahlenempfindlicher als ältere Kinder (Hall EJ 2006, Sadetzki S & Mandelzweig L 2009).

Aufgrund des vermutlich geringen Einflusses von Umweltfaktoren bestimmt insbesondere bei Kindern und Jugendlichen die genetische Prädisposition das individuelle Krebsrisiko (Kennedy RD & D'Andrea AD 2006, Sehl ME et al. 2009). Die frühe Entwicklung der meisten embryonalen Tumoren und die Ähnlichkeit mit embryonalem Gewebe geben Hinweise darauf, dass pränatale und insbesondere genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Bislang bekannte hereditäre Erkrankungen sind für etwa 5-10 % der kindlichen Krebserkrankungen ursächlich (Birch JM 1999). Seltene hereditäre Tumorprädispositionssyndrome, die durch eine gestörte DNA-Reparatur charakterisiert sind und mit erhöhtem Malignomrisiko einhergehen, weisen auf die Möglichkeit einer genetisch bedingten, unzureichenden Reparaturfähigkeit von DSB als eine Ursache für kindliche Malignome hin (D'Andrea AD & Grompe M 2003, Kennedy RD & D'Andrea AD 2006, Shiloh Y 2003).

2.4.3 Therapie

Die Therapie von Kindern mit Tumorerkrankungen erfolgt in Deutschland zentralisiert im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte. In neun deutschen Kliniken wurden jährlich je etwa 50 Neuerkrankungen behandelt, dies entspricht schon einem Drittel aller neuerkrankten Kinder (DKKR, Jahresbericht 2006/2007). Der Behandlungsstrategie liegt eine Kombination

aus den drei Grundpfeilern der systemischen Polychemotherapie, der operativen Therapie und der Strahlentherapie zugrunde. Pädiatrisch-onkologische Patienten werden mit standardisierten Therapieprotokollen im Rahmen von Studien behandelt. Diese haben eine risikoadaptierte, patientenangepasste und multidisziplinäre Behandlung zum Ziel, die den Patienten unter größtmöglicher Lebensqualität zur Heilung oder zum längeren Überleben führt. Die meisten Malignome im Kindesalter sind hoch chemosensitiv und können durch eine präoperative Chemotherapie verkleinert, teilweise sogar makroskopisch eradiziert werden. Deshalb erfolgt zu Behandlungsbeginn meist eine Polychemotherapie, die durch operative und strahlentherapeutische Behandlung ergänzt wird. Zytostatika zerstören sich schnell teilende Zellen durch Bindung an Zielmoleküle, was Zellschäden verursacht und dadurch unter anderem zur Apoptose führt (Johnstone RW et al. 2002). Demzufolge werden nicht nur die Tumorzellen, sondern auch die Zellen des hämatopoetischen Systems, der Schleimhäute und der Haarbildung angegriffen. Es muss eine supportive Therapie mit strikter Infektionsprophylaxe erfolgen. Um Resistenzen zu vermeiden, erfolgt meist eine Polychemotherapie, bei der unterschiedliche Wirkmechanismen kombiniert werden (Gillet JP & Gottesmann MM 2010).

Die operative Therapie hängt bei den pädiatrischen Malignomen sehr von der Tumorart ab. Ziele können die Tumorresektion, die Tumorverkleinerung oder die Extirpation von Metastasen sein.

Einen hohen Stellenwert hat zudem die Strahlentherapie, insbesondere bei der Behandlung maligner Hirntumore und Sarkome. Die Radiotherapie kann synchron oder sequentiell zur Chemotherapie erfolgen. Durch simultane Radiochemotherapie wird die Effektivität der Behandlung gesteigert, es können aber auch vermehrte Früh- und Spätfolgen der Bestrahlung auftreten.

Eine weitere Therapieoption ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation. Sie wird insbesondere bei der Therapie von Leukämien, Lymphomen oder bei Hochrisikokonstellationen von Neuroblastomen, Ewing-Sarkomen oder Medulloblastomen eingesetzt (Barfield RC et al. 2008, Cooper LJ 2009).

In jedes Therapiekonzept sind weiterhin Kinderpsychologen, Psychotherapeuten und Sozialarbeiter eingebunden, um eine gute psychische und soziale Rehabilitation von Kind, Eltern und Geschwistern zu ermöglichen.

In den letzten Jahrzehnten hat die ständige Weiterentwicklung dieser komplexen multimodalen Behandlungsprotokolle zu weitreichenden Verbesserungen im Überleben krebskranker Kinder geführt. Alle Therapiekonzepte mit Chemo- oder Radiotherapie können

jedoch früh oder spät auftretende Nebenwirkungen verursachen. Spätfolgen der Therapie von onkologischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter werden in Deutschland unter anderem im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH), im Register zur Erfassung radiogener Spätfolgen bei Kindern und Jugendlichen (RiSK-Studie) der GPOH (Bölling T et al. 2007a und 2007b), im *late effects surveillance system* (LESS) (Langer T et al. 2004) und im Deutschen Kinderkrebsregister erfasst.

2.4.4 Prognose

Durch bessere diagnostische und therapeutische Möglichkeiten haben sich die Mortalitätsrate und die Überlebenswahrscheinlichkeit in Deutschland in den letzten Jahren stark verändert: 1991 lag die Mortalitätsrate (Tod innerhalb von fünf Jahren nach Diagnose) noch bei 3,1 pro 100.000, 2001 lag sie bei 2,3 pro 100.000 Patienten (DKKR). Die Wahrscheinlichkeit fünf Jahre nach Diagnosestellung eines therapierten kindlichen Malignoms noch zu leben, lag Anfang der 80er Jahre noch bei 70 %, nach den neuesten Daten des DKKR liegt sie heute bei 83 %.

Bei optimaler Therapie können nach Angaben des DKKR heute über 75 % der krebskranken Kinder und Jugendlichen geheilt werden. Die Heilungsraten und Überlebenswahrscheinlichkeiten sind für die einzelnen Tumorarten sehr unterschiedlich: Beim Hodgkin-Lymphom beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 98 %, beim Nephroblastom 94 %, beim Osteosarkom 76 %, hingegen bei einem primitiven neuroektodermalen Tumor nur 42 % (DKKR, Jahresbericht 2009). Da Rezidive im Kindes- und Jugendalter meist innerhalb der ersten drei Jahre nach Diagnose auftreten, sind die obigen Zahlen fast identisch mit den Heilungsraten. Die kumulative Mortalität 30 Jahre nach Krebsdiagnose wird mit 18,1 % angegeben (Armstrong GT et al. 2009).

Die zunehmenden Behandlungserfolge und Überlebensraten führen zu einer steigenden Patientenpopulation, die es in der Nachsorge langfristig zu überwachen und zu therapieren gilt. In den USA ist heute einer von 640 Menschen zwischen 20 und 39 Jahren ehemaliger pädiatrischer Krebspatient (Hewitt M et al. 2003). Auch die Nachsorge ist im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien geregelt: Zweitmalignome, Rezidive und Spätfolgen von Therapien und Krankheitsprozessen sollen verhindert oder früh erkannt werden. Etwa zwei Drittel der Überlebenden leiden an Spätfolgen, ein Viertel ist schwer bis lebensbedrohlich betroffen. Die meisten Spätfolgen sind neurokognitive, psychologische, kardiopulmonale, endokrine und muskuloskeletale Erkrankungen sowie Zweittumoren (Hewitt M. et al 2003).

Durch Chemo- oder Radiotherapie verursachte Schäden an Organsystemen werden oft erst Jahre später klinisch apparent (Dickerman JD 2007, Oeffinger KC et al. 2006, Eiser C 1998). In der *Childhood Cancer Survivor Study* betrug die kumulative Inzidenz chronischer Krankheitsfolgen innerhalb von 30 Jahren nach Erstdiagnose über 70 %, das Risiko schwerer oder lebensbedrohlicher Erkrankungen war achtmal höher als in der Kontrollgruppe (Oeffinger KC et al. 2006).

Endokrine Störungen als Therapie- oder Krankheitsfolge treten bei 20-50 % der Überlebenden auf (Gleeson HK & Shalet SM 2001, Sklar CA 2001). Langfristige psychologische Probleme entstehen bei etwa 10-20 % der Patienten (Hudson MM et al. 2003). Zudem besitzen Langzeitüberlebende kindlicher Tumoren ein erhöhtes Risiko Zweitmalignome zu entwickeln; die kumulative Inzidenz liegt bei etwa 3 % innerhalb von 20 Jahren nach der Erstdiagnose (Neglia JP et al. 2001, Olsen JH et al. 1993). Die Zeitangaben bis zum Auftreten des Zweittumors differieren je nach Beobachtungszeitraum: Nach Klein G et al. (2003) liegt der Erkrankungszeitpunkt im Mittel 5,2 Jahre nach der Diagnose des Primärtumors, nach Neglia JP et al. (2001) vergehen durchschnittlich 11,7 Jahre nach Erstdiagnose. Leukämien treten früher auf als solide Tumoren (Klein G et al. 2003, Neglia JP et al. 2001). Das Auftreten von Sekundärmalignomen hängt von vorherigen Behandlungen und der individuellen Prädisposition ab. Zu den Risikofaktoren gehören die Radiotherapie und die Chemotherapie, insbesondere Alkylanzien und Epipodophyllotoxine (Felix CA 2001, Le Deley MC et al. 2003) im Rahmen der Ersttumortherapie. Patienten mit genetischer Prädisposition für Tumoren zeigen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Zweitmalignomen (Bisogno G et al. 2004, Kony SJ et al. 1997, Neglia JP et al. 2001). Bis zu sechs Jahre nach der Erstdiagnose treten am häufigsten Leukämien (35 %), ZNS-Tumoren (22 %), Karzinome und Lymphome (jeweils 13 %) auf (Klein G et al. 2003). Ist der Nachsorgezeitraum länger, so treten in absteigender Reihenfolge Mammakarzinome, Schilddrüsenkarzinome, ZNS-Tumoren, Knochen- und Weichgewebstumoren auf; diese sind unter anderem mit vorheriger Radiotherapie assoziiert (Bisogno G et al. 2004, Neglia JP et al. 2001). Brustkrebs tritt gehäuft bei ehemaligen M. Hodgkin-Patientinnen auf (Bhatia S et al. 1996, Dickerman JD 2007, Neglia JP et al. 2001, Oeffinger KC et al. 2006), ZNS -Tumoren gibt es gehäuft bei ehemaligen Leukämie- und Hirntumorpatienten (Neglia JP et al. 2001). Neglia et al. (2006) zeigten signifikante, linear dosisabhängige Zusammenhänge zwischen dem Auftreten sekundärer ZNS-Tumoren und vorangegangener Strahlentherapie. Therapeutische Bestrahlung entsprechender Lokalisation erhöht bedeutend das Risiko ein Schilddrüsenmalignom zu entwickeln (Sigurdson AJ et al. 2005, Tucker MA et al. 1991).

Henderson TO et al. (2007) beschreiben ein neunfach erhöhtes Risiko für Überlebende pädiatrischer Malignome an einem Sarkom zu erkranken. Erhöhtes Risiko bestand bei Radiotherapie, höheren Anthrazyklin- oder Alkylanzidosen, primärem Sarkom, M. Hodgkin oder weiteren Zweitmalignomen in der Vorgeschichte.

In Anbetracht der hohen Heilungschancen gewinnen die Erforschung der physischen und psychosozialen Langzeitfolgen, sowie der Lebensqualität an Interesse und Bedeutung (Calaminus G et al. 2007, Zeltzer LK et al. 2009).

2.5 Tumor-Prädisposition infolge defizienter DNA-Reparatur

Eine funktionierende DNA-Reparatur ist für die Beseitigung von DNA-Schäden essentiell. Insbesondere DSB in der DNA sind für die genomische Integrität bedrohlich, wenn sie nicht, unzureichend oder falsch repariert werden. Einerseits kann es durch einen DSB zur Arretierung des Zellzyklus und zum Zelluntergang kommen, andererseits können genetisch unbalancierte Zellen mit veränderten Wachstumseigenschaften, potenzielle Tumorzellen, entstehen. (Chistiakov DA et al. 2008, Sakata K et al. 2007). Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen oder in Stabilitätsgenen der DNA sind für Zellentartung und malignes Wachstum verantwortlich (Vogelstein B & Kinzler KW 2004).

Es gibt verschiedene genetische Erkrankungen mit defizienter DNA-DSB-Reparatur, unter anderem die Ataxia telangiectasia (AT), das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) oder das LIG4-Syndrom, die mit erhöhter Radiosensitivität und Tumorneigung einhergehen. Andere hereditäre Tumorprädispositionssyndrome betreffen verschiedene weitere Proteine in dem noch nicht vollständig erforschten Gebiet der DNA-Reparatur; hierzu zählen zum Beispiel die Fanconi-Anämie, das Turcot-Syndrom oder das Beckwith-Wiedemann-Syndrom. Nur etwa 5-10 % der Malignome beim Menschen treten in Zusammenhang mit solchen, bisher bekannten, Erkrankungen auf (Birch JM 1999, Garber JE & Offit K 2005). Es kann davon ausgegangen werden, dass es genetische Ursachen in der Bevölkerung, somit auch bei Kindern gibt, die auf noch unbekannt Weise die DSB-Reparaturmechanismen negativ beeinflussen (Kennedy RD & D`Andrea AD 2006, Bartsch H et al. 2007, Chistiakov DA et al. 2008, Birch JM 1999). Bestimmte Kinder können somit aufgrund ungünstiger genetischer Varianten empfindlicher gegenüber Strahlung, anderen Umwelteinflüssen und endogenen Faktoren sein und zur Malignomentwicklung neigen. Im Folgenden werden einige der bereits bekannten Tumorprädispositionssyndrome dargestellt.

2.5.1 Ataxia telangiectasia

Die AT ist eine autosomal rezessiv vererbte Multisystemerkrankung, welche mit immunologischer Dysfunktion, zerebellärer Degeneration, chromosomaler Instabilität, abnormaler Radiosensitivität und einem erhöhten Krebsrisiko einhergeht (Boder E & Sedgwick RP 1958). Die Häufigkeit liegt bei 1: 40 000 (Chun HH & Gatti RA 2004). Die Zahl der heterozygoten Träger der Mutation wird mit 1 % angegeben. Die AT wird durch homozygote Mutationen im AT-Gen auf Chromosom 11q22-23 verursacht (Gatti RA et al. 1988). Das zugehörige Protein wird als ATM bezeichnet (Savitsky K et al. 1995). Dieses ist ein 350-kiloDalton(kDa)-Protein, eine Phosphatidylinositol-3-Kinase, welche in der Signalvermittlung bei DNA-Schäden, insbesondere nach DSB, die zentral regelnde Rolle spielt (Shiloh Y 2003). Nach der Einwirkung ionisierender Strahlung, die unter anderem DSB verursacht, bewirkt ATM einen Zellzyklusarrest an den G1/S-, intra-S- und G2/M-Phase-Checkpoints. Dies ermöglicht der Zelle eine koordinierte DSB-Reparatur. Ist der Schaden an der DNA zu groß für eine effektive Reparatur, kontrolliert ATM auch den Übergang in die Apoptose (Löbrich M & Jeggo PA 2005).

Entsteht durch ionisierende Strahlung ein DNA-Schaden, so wird das ATM-Protein aktiviert und gibt diese Information durch Phosphorylierung verschiedener Reparatur- und Zellzykluskontrollproteine wie p53 weiter, wodurch die Zelle zur DNA-Reparatur im Zellzyklus arretiert. Ist das ATM-Gen homozygot mutiert, können Proteine wie p53 nicht oder nur unzureichend aktiviert werden. Dies bedeutet, dass die Zelle sich nicht in Arrest begibt, um den Schaden zu reparieren, sondern sich trotz genomischer Desintegrität in die Mitose begibt (Chun HH & Gatti RA 2004, Rosen EM et al. 1999). Weiterhin scheint ATM bei der Reparatur von Telomeren eine Rolle zu spielen. Stammzellen ohne funktionierendes ATM besitzen im Zustand der replikativen Seneszenz verkürzte Telomeren. Bei den meisten AT-Patienten wird kein ATM-Protein gebildet, in etwa 15 % der Fälle ist noch Restprotein nachweisbar und es gibt auch Varianten mit quantitativ ausreichendem, aber funktionslosem Protein (Chun HH & Gatti RA 2004). Neurologisch zeigen die Patienten schon früh, aufgrund des zunehmenden Verlusts von Purkinjezellen im Kleinhirn, in unterschiedlichem Ausmaß eine progressive Ataxie, Choreoathetose, dysarthrische Sprache und eine okulomotorische Apraxie. Weitere Krankheitsmanifestationen sind okulokutane Telangiektasien, eine gestörte humorale und zelluläre Immunabwehr und eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, sowie ein etwa hundertfach erhöhtes Krebsrisiko (De la Torre C et al. 2003). AT-Zellen haben eine drei- bis vierfach erhöhte Strahlenempfindlichkeit (Taylor AM et al. 1975)

und können strahleninduzierte Schäden schlechter reparieren (Löbrich M et al. 2000, Rube CE et al. 2008b und 2010).

Etwa ein Drittel der Patienten erkrankt an malignen Tumoren, jüngere Kinder eher an akuter lymphatischer Leukämie oder B-Zell-Lymphomen, Jugendliche eher an T-Zell-Lymphomen oder an T-Zell-prolymphatischer Leukämie, ältere AT-Patienten eher an nichtlymphatischen, soliden Malignomen (Chun HH & Gatti RA 2004). AT-Heterozygote zeigen in abgeschwächter Form ebenfalls erhöhte Radiosensitivität, Chromosomeninstabilität und ein mehr als dreifach erhöhtes Krebsrisiko (Rosen EM et al. 1999, Rube CE et al. 2010, Thompson D et al. 2005).

Weitere sehr seltene AT-ähnliche Tumorprädispositionssyndrome mit hoher Radiosensitivität sind die *Ataxia telangiectasia-like disorder* (ATLD) mit einer Mutation im MRE11-Gen (Stewart GS et al. 1999) und die *Radiation-sensitive severe combined immunodeficiency* (RS-SCID) durch Mutationen im Artemis-Gen, welches bei der DSB-Reparatur beteiligt ist (Noordzi JG et al. 2003).

In unserer Arbeitsgruppe wurden Familien von Patienten mit AT durch Lymphozytenuntersuchungen mit der γ H2AX-Methode getestet (Rube CE et al. 2010). Mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode nach ex vivo-Bestrahlung von Blutlymphozyten der homozygoten Patienten und ihren heterozygoten Eltern konnten unterschiedlich stark abgeschwächte DSB-Reparaturfähigkeiten nachgewiesen werden. Die heterozygoten Eltern der Patienten reparierten schlechter als Probanden ohne Mutation und besser als die AT-homozygoten Patienten (Rube CE et al. 2010).

2.5.2 Nijmegen breakage Syndrom

Das NBS ist ein seltenes, autosomal-rezessiv vererbtes, Tumorprädispositionssyndrom, das durch eine hypomorphe Mutation im NBS1-Gen auf Chromosom 8 (8q21) entsteht (Taalman RD et al. 1983, Matsuura S et al. 1998). Ein Großteil der Patienten ist homozygot für die Mutation 657del5, wodurch ein beschädigtes Protein mit Restaktivität entsteht (Krüger L et al. 2007). Das NBS1-Gen kodiert für Nibrin (NBS1), ein 95 kDa großes Protein des MRN-Proteinkomplexes. Dieser Komplex initiiert die DSB-Reparatur durch die HR, nachdem es durch das ATM-Protein phosphoryliert wurde. Die genomische Instabilität bei NBS-Patienten folgt damit aus der defekten homologen Rekombination. NBS1 interagiert über den MRN-Komplex direkt mit γ -H2AX an DSB in der DNA und ATM bildet über NBS1 einen Komplex mit γ -H2AX, was entscheidend für die Rekrutierung von ATM zu DSB und damit für die DNA-DSB-Reparatur ist (Kobayashi J et al. 2009). Klinisch zeigt sich ein erhöhtes

Krebsrisiko, eine erhöhte Radiosensitivität, eine Immundefizienz, eine Mikrozephalie, charakteristische Gesichtszüge und eine Wachstumsretardierung. An der Haut können eine Vitiligo oder Café-au-lait Flecken, am Augenhintergrund Pigmentablagerungen auftreten (Digweed M & Sperling K 2004).

2.5.3 Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie wurde 1927 von Guido Fanconi zum ersten Mal beschrieben. Dieses seltene, meist autosomal rezessiv vererbte Chromosomeninstabilitätssyndrom ist durch Tumorprädisposition, Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und DNA-vernetzenden Chemotherapeutika, Fehlfunktion des Knochenmarks, angeborene Fehlbildungen, Hautveränderungen und Wachstumsretardierung charakterisiert (Fanconi G 1927, Bagby GC & Alter BP 2006). Die Prävalenz beträgt 4 - 7: 1 Million Lebendgeborenen (Gulbis B et al. 2010), bis zu 0,5 % der Gesamtbevölkerung sind Träger einer heterozygoten Mutation (Auerbach AD 2009). Derzeit sind dreizehn verschiedene Komplementationsgruppen bekannt: FANC-A, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, -M und FANC-N, möglicherweise gehört auch RAD51C dazu (Reid S et al. 2007, Tischkowitz M & Xia B 2010). 65 % der Fälle gehören zur Gruppe FANC-A, hierbei liegt der Gendefekt auf dem Chromosom 16q24.3. Etwa 25 % der Patienten haben Mutationen im FANC-C- oder FANC-G-Gen, die restlichen Komplementationsgruppen haben einen Anteil von 2 - 0,2 % (Kutler DI et al. 2003, Tischkowitz MD & Hodgson SV 2003). Die seltene Komplementationsgruppe FANC-B wird X-chromosomal vererbt (Rahman N & Ashworth A 2004). Die FANC-Gene gehören wie ATM, NBS und andere Gene zu den sogenannten Genen mit *caretaker*-Funktion. Diese sorgen durch die Erkennung und Behebung von DNA-Schäden, die durch exogene und endogene Faktoren permanent in unseren Körperzellen entstehen, für die Stabilität unseres Genoms (Kinzler KW & Vogelstein B 1997, Tischkowitz M & Xia B 2010).

Die meisten FANC-Proteine sind am sogenannten FA/BRCA-Weg beteiligt. Dies bedeutet, dass die FANC-Genprodukte in Interaktion mit BRCA1, ATM, NBS1 und RAD51 an der Regulation des Zellzyklus und an DNA-Reparatur-Wegen, insbesondere an der HR beteiligt sind und so zur genetischen Stabilität unserer Körperzellen beitragen (D'Andrea AD & Grompe M 2003). Als Reaktion auf eine DNA-Schädigung bilden acht FANC-Proteine (A, B, C, E, F, G, L, M) einen Kernkomplex, der FANCI und FANCD2 durch Monoubiquitinierung aktiviert (D'Andrea AD & Grompe M 2003, Wang W 2007). Aktiviertes FANCI und FANCD2 bilden nun einen Komplex, der an der Stelle des DNA-Schadens zusammen mit anderen Reparaturproteinen wie BRCA1, FANCD1 (entspricht BRCA2), FANCN (entspricht

PALB2, dem Partner von BRCA2), FANCI (entspricht BRIP1) und RAD 51 nukleare Foci bilden (Xia B et al. 2006 und 2007, Wang W 2007, Tischkowitz M & Xia B 2010). Diese Foci sind immunhistochemisch nachweisbare, topographische Marker für die an der DNA-Reparatur beteiligten Proteinkomplexe. Defekte im FA/BRCA-Weg führen zu einem verlängerten S/G2-Phase-Arrest im Zellzyklus und zu einer fehlerhaften DNA-DSB-Reparatur (D'Andrea AD & Grompe M 2003).

Die genetische Heterogenität der Erkrankung erklärt die Heterogenität der Symptome. An charakteristischen Merkmalen können Hautpigmentveränderungen, Kleinwuchs, Fehlbildungen der oberen und unteren Extremität, Hypogonadismus, Nieren-, Augen- und Ohrenfehlbildungen, sowie gastrointestinale und kardiopulmonale Fehlbildungen auftreten (Auerbach AD 2009). Kinder mit Fanconi-Anämie entwickeln häufig in der ersten Lebensdekade eine Thrombozytopenie. Es können Anämie oder Leukopenie bis hin zur Panzytopenie folgen, die durch chromosomale Veränderungen in Progenitorzellen im Knochenmark entstehen (D'Andrea AD & Grompe M 2003). Diese Chromosomenstörungen im Knochenmark können dann zur Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) oder einer akuten myeloischen Leukämie (AML) führen. Für die AML haben Fanconi-Patienten ein etwa 15.000fach erhöhtes Risiko (Tischkowitz MD & Hodgson SV 2003), 52 % entwickeln innerhalb von 40 Jahren ein MDS oder eine AML (Auerbach AD 2009). Ansonsten treten solide Tumoren, vor allem Hirntumoren und Plattenepithelkarzinome, auf (Rosenberg PS et al. 2008).

Neben der klinischen Diagnose erfolgt die Bestätigung durch eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit in Lymphozyten nach Exposition mit Diepoxybutan oder Mitomycin C (Auerbach AD 2003). Weitere diagnostische Möglichkeiten sind Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie, die Komplementationanalyse und die Mutationsanalyse. Bei unklaren Ergebnissen gibt es, durch Kombination von Methoden, die Möglichkeit eines Mitomycin-C-Sensitivitäts-Tests in Fibroblasten (Pinto FO et al. 2009). Nach einer neueren Studie führt die Untersuchung von Fibroblasten mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz zur Unterscheidung zwischen Patienten mit Fanconi-Anämie und anderen Ursachen von Knochenmarksversagen (Leskovac A et al. 2010).

Symptomatisch kann das Knochenmarksversagen mit Androgenderivaten und Blutprodukten therapiert werden, die derzeit einzig kurative Behandlungsmöglichkeit ist die Transplantation von hämatopoietischen Stammzellen, ein erhöhtes Risiko für Plattenepithelkarzinome bleibt danach jedoch erhalten (Millen FJ et al. 1997, Salum FG et al. 2006).

2.5.4 Turcot-Syndrom

Das Turcot-Syndrom ist eine, 1959 zum ersten Mal beschriebene, sehr seltene Erbkrankheit, bei dem ZNS-Tumoren zusammen mit kolorektalen Polypen auftreten (Turcot J et al. 1959). Seit der Erstbeschreibung der Erkrankung wurden weniger als 200 Patienten identifiziert (Lusis EA et al. 2010). An zerebralen Tumoren treten zu etwa 60 % Gliome jeglicher Dignität, Medulloblastome, aber auch Lymphome, Meningeome, Hypophysenadenome und Kraniopharyngeome auf (Paraf F et al. 1997). Dem Syndrom können molekulargenetisch zwei hereditäre Erkrankungen mit kolorektalen Karzinomen zugeordnet werden: die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP-Syndrom) und das HNPCC-Syndrom (hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom). In 75 % der Fälle liegt eine Mutation im APC (*adenomatous polyposis coli*)-Gen vor (Sjursen W et al. 2009), dies verursacht die familiäre adenomatöse Polyposis, hierbei sind die intestinalen Tumore vorwiegend mit Medulloblastomen assoziiert (Turcot-Syndrom Typ 2). Der Typ 1 des Turcot-Syndroms entsteht durch Mutationen in Mismatch-Reparatur (MMR)-Genen (*mutS homolog 2* (MSH2), *mutS homolog 6* (MSH6), *human MutL homolog 1* (hMLH1), *human postmeiotic segregation 1* und *2* (hPMS1 und hPMS2)). Diese Patienten werden als Subgruppe des HNPCC-Syndroms gesehen und entwickeln an zerebralen Tumoren hauptsächlich Glioblastome (Hamilton SR et al. 1995, Lusis EA et al. 2010). Durch biallele Mutationen in einem der genannten MMR-Gene kommt es zu Fehlern in der DNA-Sequenz nach dem Replikationsvorgang. Das MMR-System eliminiert Basenfehlpaarungen, sowie Insertionen und Deletionen und hilft so, die Integrität des Genoms zu gewährleisten. Fehler führen zu Mutationen und zur Mikrosatelliteninstabilität, dem Kennzeichen einer defekten MMR-Reparatur (Gottschling S et al. 2008). Mikrosatelliten sind kurze, repetitive, nicht-kodierende DNA-Sequenzen. Turcot-Patienten mit einem MMR-Defekt haben neben ZNS-Tumoren auch hämatologische maligne Erkrankungen und häufig Café-au-lait-Flecken (De Vos M et al. 2005).

2.5.5 Beckwith-Wiedemann-Syndrom

Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom ist eine Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 1:10.000-15.000 Geburten auftritt und die mit Großwuchs, Hypoglykämie in der Neonatalperiode, Bauchwanddefekten und Tumorprädisposition einhergeht (Cohen MM Jr 2005). Die Erkrankung wurde zunächst als Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom bezeichnet und von Beckwith (1963) und Wiedemann (1964) erstmals beschrieben. Annähernd 85 % der berichteten Fälle treten sporadisch, 15 % familiär gehäuft auf (Choufani S et al. 2010). Pränatal wegweisend sind ein Polyhydramnion, eine übergroße Plazenta und

eine lange Nabelschnur, häufig kommt es zur Frühgeburtlichkeit (Weng EY et al. 1995). Weitere klinische Zeichen sind eine Makroglossie, eine typische Ohrmuschelfältelung und eine Viszeromegalie. An Bauchwanddefekten treten Omphalozelen, umbilikale Hernien und Rektusdiastasen auf. Seltener kommt es zu Hemihypertrophien, Nieren- und Herzfehlbildungen, Kardiomyopathien und Gaumenspalten (Weksberg R et al. 2003, Cohen MM Jr 2005). In Abhängigkeit von der genetischen Ursache können sich bei Tumorprädisposition Nephroblastome, Neuroblastome, Hepatoblastome, Rhabdomyosarkome und Nebennierenkarzinome entwickeln (Wiedemann HR 1983, Tan TY& Amor DJ 2006).

Die Ätiologie des Beckwith-Wiedemann-Syndroms ist komplex. Die Erkrankung tritt zum größten Teil sporadisch auf und entsteht meist durch Methylierungsstörungen in einer der beiden Imprinting-Kontrollregionen des Chromosoms 11p15.5 oder durch paternale uniparentale Disomie. Epigenetische oder genetische Veränderungen in den Imprinting-Domänen auf dem Chromosom 11p15.5, welche Wachstumsregulationsgene steuern, stellen die Hauptursache dar (Weksberg R et al. 2003, Enklaar T et al. 2006; Choufani S et al. 2010). Genomisches Imprinting bedeutet die allelspezifische Expression von Genen durch Modifikation von Histonproteinen oder Nukleotiden in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung (Brannan CI & Bartolomei MS 1999, Pfeifer K 2000). Die erste Imprinting-Domäne des Chromosoms 11p15.5 kontrolliert die Expression des *insulin-like-growth factor 2* (IGF2) und von H19, welches für nicht translatierte RNA kodiert. Die zweite Imprinting-Region steuert CDKN1C, ein Gen das zur Wachstumshemmung führt, und KCNQ10T1, das für nicht translatierte RNA kodiert (Blick J et al. 2009). Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom kann durch Überexpression von IGF2 (Domäne 1), durch verminderte Expression von CDKN1C (Domäne 2) oder weitere Veränderungen entstehen, ursächlich sind unterschiedliche zytogenetische oder molekulargenetische Vorgänge (Weksberg R et al. 2003): Bei etwa 55 % der Patienten ist eine Hypomethylierung der zweiten Imprinting-Domäne des KCNQ10T1-Gens ursächlich; es besteht ein erhöhtes Risiko für embryonale Tumoren, jedoch nicht für das Nephroblastom. Bei 7 % der Patienten besteht eine Hypermethylierung der ersten Imprinting-Region, hier ist das Risiko der Entwicklung eines Nephroblastoms oder Hepatoblastoms erhöht (Blick J et al. 2001, Choufani S et al. 2010). In 10-20 % der Erkrankungsfälle besteht eine paternale uniparentale Disomie 11p15; das bedeutet, dass das maternale Allel verloren gegangen ist und das paternale Allel nun doppelt vorliegt, wodurch verstärkt IGF2 exprimiert wird. Bei der uniparentalen Disomie ist das Risiko für ein Nephroblastom oder Hepatoblastom stark erhöht und es tritt häufig eine Hemihypertrophie auf (Choufani S et al. 2010). In 10 % werden Punktmutationen im

CDKN1C-Gen nachgewiesen; dieser Defekt ist häufig mit einer Omphalozele und einer Gaumenspalte, selten auch mit einem Neuroblastom assoziiert (Lam WW et al. 1999). In seltenen 1-2 % der Fälle ist eine strukturelle Veränderung des Chromosoms 11p15 ursächlich. Atypische Fälle des Syndroms entstehen durch Hypomethylierungen an verschiedenen maternal methylierten Imprinting-Regionen (Blik J et al. 2009). Zusammenhänge zwischen dem Auftreten eines Beckwith-Wiedemann-Syndroms und einer vorherigen In-vitro-Fertilisation wurden beschrieben (Lim D et al. 2009). Das höchste Tumorrisiko besteht bei der paternalen uniparentalen Disomie und bei der Hypermethylierung der ersten Imprinting-Region auf Chromosom 11p15.5 (Choufani S et al. 2010).

2.6 Strahlentherapie: Früh- und Spättoxizitäten

Die Strahlentherapie ist ein elementarer Bestandteil der multimodalen Behandlungskonzepte bei der Therapie von Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Vor allem bei Sarkomen, bei Hirntumoren, bei Leukämierезидивen und vor einer hämatopoietischen Stammzelltransplantation wird sie bei Kindern eingesetzt. Etwa 800 Kinder werden pro Jahr in Deutschland therapeutisch bestrahlt (Bölling T et al. 2007a). Radiotherapie wird kurativ und mit sehr guten lokalen Ergebnissen auch palliativ in der kinderonkologischen Behandlung eingesetzt. Abhängig vom Entwicklungsstand und der Motivation des Kindes muss während der Bestrahlung eine Sedierung erfolgen.

Nicht alle kindlichen Tumoren sind strahlensensibel, allgemein gilt eine höhere Strahlensensibilität für mitotisch aktive Zellen wie Leukämie- oder Lymphomzellen im Gegensatz zu differenzierten Zellen eines Teratoms. Ebenso sind im gesunden Gewebe beispielsweise die sich häufig teilenden Schleimhautzellen weitaus strahlensensibler als sich seltener teilende Myozyten (Rosen EM et al. 1999).

Die Intensität der Bestrahlung wird soweit wie möglich an das individuelle Risiko des Kindes angepasst. Hierzu führt man eine individuelle dreidimensionale CT (Computertomographie)- oder auch Magnetresonanztomographie- gestützte Bestrahlungsplanung durch (Bölling T et al. 2006). Durch hochpräzise Planung, individuelle Lagerung des Patienten und exakte Fokussierung der Strahlung ins Zielgebiet wird umliegendes Gewebe geschont. In der pädiatrischen Radioonkologie wird vorwiegend die Teletherapie im Sinne einer Photonenbestrahlung mit Energien zwischen 4 und 10 Megavolt (MV) eingesetzt, jedoch nutzt man auch ⁶⁰Co-Quellen, Elektronen- und Protonenstrahlen. Die verschiedenen Techniken werden auch kombiniert eingesetzt (Bölling T et al. 2006). Meist wird das

Zielgebiet über mehrere Felder bestrahlt, so kann die Strahlendosis besser fokussiert und gesundes Gewebe besser geschont werden. Die Gesamtdosis einer therapeutischen Bestrahlung wird fraktioniert gegeben, beispielsweise 1,5 - 2,0 Gray (Gy) pro Tag an fünf Tagen in der Woche über einen Zeitraum von 2-6 Wochen (konventionelle Fraktionierung). Dadurch wird das Normalgewebe geschont und auf das Tumorgewebe wird eine selektiv höhere Wirkung erzielt (Bentzen SM 1993).

Entscheidend für den Einsatz und die Intensität der Bestrahlung sind der zu erwartende Nutzen versus möglicher Nebenwirkungen und Komplikationen. Die Mehrzahl der pädiatrischen und erwachsenen Patienten, die strahlentherapeutisch behandelt werden, übersteht diese ohne oder mit nur geringen Nebenwirkungen. Sie treten jedoch trotz genauester Planung und Risikoabschätzung bei manchen Patienten auf und können lebensbedrohliche Folgen haben: Akute Nebenwirkungen bei Kindern und Jugendlichen unterscheiden sich kaum von denen des Erwachsenenalters. Sie treten durch das Absterben einer großen Zellzahl während oder kurz nach der Therapie auf, sind überwiegend reversibel und können durch supportive Maßnahmen gemildert werden. Die akuten Effekte betreffen vorwiegend schnell proliferierende Gewebe wie die Haut, Schleimhäute oder das blutbildende Knochenmark. Nach erfolgter Strahlenbehandlung kann der Schaden durch die rasche Proliferation von Stammzellen meist komplett wieder ausgeglichen werden. Demgegenüber werden chronische Nebenwirkungen auch durch das Alter des Kindes und den Entwicklungsstatus des betroffenen Organs bestimmt. Je jünger das Kind und je weniger entwickelt das Organ, desto ausgeprägter die Spättoxizität der Radiotherapie. Jüngere Patienten sind stärker von Spätfolgen wie Wachstumsretardierung und Zweittumoren betroffen (Rosen EM et al. 1999). Spätreaktionen nach Radiotherapie treten Monate ($\geq 6-9$) oder Jahre nach der Therapie auf, sie sind meist irreversibel und limitieren dadurch die zu applizierende Strahlendosis und somit die Heilungschancen (Bentzen SM 1993, Hall EJ 2000 S. 340).

Spätfolgen betreffen Organe wie Lunge, Leber oder das ZNS und das Gefäßendothel sowie Binde- und Stützgewebe. Betroffen sind zum einen die Organe oder Gewebe im Bestrahlungsfeld, zum anderen kann sich ein Zweittumor in oder außerhalb des Feldes entwickeln.

In welchem Ausmaß es zu Strahlenfolgen kommt, hängt von vielen Faktoren ab: von der Qualität und Quantität der Bestrahlung, von der Lokalisation und dem Volumen des bestrahlten Gewebes, von der Kombination mit Chemotherapie oder einer Operation im Bestrahlungsfeld sowie der Koexistenz weiterer medizinischer Probleme die einen

Strahlenschaden verschlimmern können (Rosen EM et al. 1999). Bei den akuten Strahlenfolgen spielt außerdem die Gesamtbehandlungszeit eine Rolle (Barber JB et al. 2000, Hall EJ 2000 S. 339-360). Da bei verstärkter Zellproliferation ionisierende Strahlen höheren Schaden anrichten, ist die Empfindlichkeit der unterschiedlichen Gewebe auch von der Wachstumsphase eines Kindes abhängig: Nervengewebe ist besonders im Säuglings- und Kleinkindesalter, Gewebe von reproduktiven Organen besonders in der Pubertät strahlensensibel (Halperin EC et al. 1999).

Bhatia S et al. (1996) und Aisenberg AC et al. (1997) zeigten ein erhöhtes Risiko ehemaliger M. Hodgkin-Patientinnen an Brustkrebs zu erkranken, die im Alter zwischen 10 und 16 Jahren, während das Brustgewebe proliferierte, eine thorakale Bestrahlung erhielten. Diese Beobachtung konnte von Neglia JP et al. (2001) jedoch nicht bestätigt werden. Eine weitere Spätfolge kann bei der Beckenbestrahlung junger Mädchen auftreten: Signorello LB et al. (2006) zeigte, dass Patientinnen, die im Kindesalter im Uterusbereich bestrahlt wurden, dosisabhängig ein bedeutend erhöhtes Risiko für Frühgeburtlichkeit und für ein niedriges Geburtsgewicht ihrer Kinder haben.

Eine bedeutende Rolle spielt die individuelle Strahlenempfindlichkeit eines Patienten (Baumann M et al. 2003, Bentzen SM 2006, Borgmann K et al. 2008). Erhöhte Radiosensitivität lässt sich bei hereditären Erkrankungen wie der AT oder der Fanconi-Anämie beobachten. Es gibt jedoch auch übermäßig strahlenempfindliche Menschen ohne bekannte genetische Ursache, die auf Bestrahlung mit sehr schweren Nebenwirkungen reagieren (Barber JB et al. 2000, Jung H et al. 2001, Löbrich M et al. 2005, Oppitz U et al. 1999, Sprung CN et al. 2005). Diese Patienten können durch die heute üblichen klinischen Untersuchungen vor einer Strahlentherapie nicht erkannt werden und werden so unwissentlich einer für sie eher ungeeigneten Therapieform zugeführt. Deshalb versuchen verschiedene Arbeitsgruppen seit Jahren prädiktive Tests zu entwickeln, um diese Patienten vor Beginn einer Strahlentherapie erkennen zu können und alternativen Therapieformen zuzuführen (Alapetite C et al. 1999, Barber JB et al. 2000, Borgmann K et al. 2002, Hoeller U et al. 2003, Jung H et al. 2001, Kabacik S et al. 2011, Leong T et al. 2004, Löbrich M & Kiefer J 2006, Müller WU et al. 2001, Oppitz U 1999, Rube CE 2008a, 2008b und 2010, Sprung CN et al. 2005) oder um stärker individualisierte Bestrahlungspläne zu entwickeln (Barber JB et al. 2000). Diese Forschungen könnten auch zum Erreichen höherer Tumorkontrollraten führen, da die therapeutische Strahlendosis durch die zu erwartenden Nebenwirkungen begrenzt wird. Könnte man im Rahmen der Bestrahlungsplanung eine besonders hohe Normalgewebs-toleranz oder -sensibilität feststellen, so ließe sich die Dosis entsprechend einer besseren

Tumorkontrolle erhöhen, bei einer erhöhten Sensibilität entsprechend einem besseren Normalgewebsschutz erniedrigen (Sprung CN et al. 2005). Auch die zugrundeliegenden Mechanismen der individuellen Prädisposition für die Entwicklung schwerer therapieassoziierter Toxizitäten sind noch Forschungsgegenstand. Eine Hypothese ist, dass diese durch Mutationen von Genen entstehen, deren Proteine in der Schadensantwort der Zelle auf eine DNA-Schädigung teilnehmen (Fernet M & Hall J 2004, Rieger KE et al. 2004, Svensson JP et al. 2006).

Von besonderer Bedeutung für die Lebensqualität der jungen Patienten sind die chronischen Strahlenspätchäden. Durch verbesserte Heilungschancen und die Möglichkeiten der Lebensverlängerung in der Pädiatrischen Onkologie treten sie häufiger in Erscheinung (Bölling T et al. 2006). Im Rahmen einer prospektiven multizentrischen Registerstudie werden seit 2004 bundesweit alle im Rahmen der GPOH-Studien behandelten Kinder mit Radiotherapie bezüglich ihrer Akut- und Spätnebenwirkungen erfasst (RiSK-Studie). Hierdurch sollen akute und chronische Nebenwirkungsrisiken besser eingeschätzt, Studienprotokolle verbessert, und die Bestrahlungsdosen an Risikoorganen mit entsprechenden Strahlenspätfolgen korreliert werden (Bölling T et al. 2006, 2007a und 2007b). Im Rahmen der RiSK-Studie erfasste Patienten mit höhergradigen Nebenwirkungen wurden meist mit Sarkom-Therapieprotokollen behandelt, wobei die Patienten mit malignen Sarkomen etwa ein Drittel der erfassten Patientenpopulation darstellten. Es konnten insgesamt nur wenig höhergradige Nebenwirkungen allein auf die Strahlentherapie zurückgeführt werden, meist sind Chemotherapeutika, Operationen oder tumorbedingte Ursachen mitbeteiligt (Bölling et al. 2007a).

2.7 Fragestellung und Ziel der Pilotstudie

Die Ursachen für Tumoren im Kindesalter sind noch nicht ausreichend erforscht und bekannt. Eine defiziente DSB-Reparatur stört die genomische Integrität und stellt nach unserer Hypothese einen bedeutenden Risikofaktor für die Tumorentstehung bereits im Kindesalter dar. Zudem kann eine beeinträchtigte DSB-Reparatur zu schweren Normalgewebstoxizitäten während einer therapeutischen Bestrahlung führen. Von besonderem Interesse hierbei sind individuelle, geringer ausgeprägte DSB-Reparatur-Defizienzen, die nicht einer bestimmten hereditären Erkrankung zugeordnet werden können. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Lymphozyten von gesunden und tumorkranken Kindern mittels der γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode untersucht, um etwaige Kinder mit einem DSB-Reparatur-Defekt

zu identifizieren und um Normalgewebstoxizitäten bei Kindern mit DNA-schädigender Therapieform zu ermitteln. Damit sollten zum einen Hinweise für die Beantwortung der Frage gefunden werden, ob durch Blutuntersuchungen mittels γ H2AX-Immunfluoreszenz Kinder mit hohem Risiko für Normalgewebstoxizitäten identifiziert werden können und ob diese Methode damit prinzipiell als prädiktiver, klinischer Test geeignet wäre, Patienten mit hohem Risiko für Normalgewebstoxizitäten zu identifizieren. Zum anderen sollten Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen defizienter DSB-Reparatur und maligner Erkrankung im Kindesalter gefunden werden.

3. Material und Methoden

3.1 Aufbau der Studie

Die Untersuchungen für diese Pilotstudie wurden von Dezember 2006 bis Mai 2008 vom Labor für Molekulare Radioonkologie (PD Dr. C.E. Rübe) in Kooperation mit der Klinik für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (Prof. Dr. N. Graf) des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Die individuelle DNA-DSB-Reparaturkapazität von Kindern mit malignen Tumoren wurde mittels γ H2AX-Immunfluoreszenz ermittelt und mit der DSB-Reparaturfähigkeit gesunder Kinder verglichen, zudem wurden die Ergebnisse der radiotherapierten Tumorkinder (TuKi) mit Normalgewebstoxizitäten nach Strahlentherapie korreliert. Hierzu wurde eine Gruppe Kinder mit histologisch gesicherten, meist soliden Tumoren (n = 23) untersucht, eine altersadaptierte Gruppe gesunder Kinder diente als Kontrolle (n = 24).

Die Rekrutierung der Patienten mit malignen Erkrankungen erfolgte in der stationären und ambulanten Abteilung der Klinik für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie der Universität des Saarlandes. Ein Kind (HNEE) wurde nach Auftreten eines Drittmalignoms über das Universitätsklinikum Gießen in die Studie aufgenommen.

Bei radiotherapierten Kindern der Tumorgruppe wurde zudem die strahleninduzierte Normalgewebstoxizität anhand der Protokolle des Registers zur Erfassung von Spätfolgen nach Strahlentherapie im Kindes- und Jugendalter (RiSK) erfasst.

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Tumorgruppe eingeschlossen wurden Kinder und Jugendliche die an einem Malignom erkrankt waren und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen einem und achtzehn Jahre alt waren. Eine Patientin mit Osteosarkom (KZBA) war zum Diagnosezeitpunkt bereits einundzwanzig Jahre alt. Leukämiepatienten wurden wegen schlechter Auswertbarkeit der Proben und möglicher proliferierender Lymphoblasten im peripheren Blut von der Studie ausgeschlossen. Die Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung der Studie möglichst keine Chemotherapie und in keinem Fall eine Radiotherapie in den letzten drei Monaten.

Vorzugsweise eingeschlossen wurden demnach erstdiagnostizierte Kinder eines soliden Tumors, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch keine Therapie erhalten hatten, sowie

Kinder, die ihre Therapie seit mindestens einem Jahr beendet hatten und zur Nachsorge in die kideronkologische Ambulanz kamen.

In die Kontrollgruppe wurden gesunde Kinder von einem Jahr bis achtzehn Jahren eingeschlossen.

Sowohl für die Tumor-, als auch für die Kontrollgruppe galt als Ausschlusskriterium eine Szintigraphie, Röntgen- oder CT-Untersuchung in den letzten 3 Tagen vor der Blutentnahme für die Studie.

3.1.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Das Untersuchungsmaterial der Studie bestand aus peripherem Blut pädiatrischer Patienten, die an einem Malignom erkrankt waren, sowie aus peripherem Blut gesunder Kinder.

Eltern und Kinder wurden vor der Blutentnahme über die von der Ethikkommission der Universität des Saarlandes am 29.11.2006 genehmigte Studie ausführlich unterrichtet. Gaben die Eltern ihr schriftliches Einverständnis, wurde den Kindern zusätzlich zur diagnostischen Blutentnahme der Kinderklinik maximal 8 ml venöses Blut für die Studie entnommen. Somit wurden die meisten Blutproben im Rahmen von routinemäßig durchgeführten, medizinisch erforderlichen Blutentnahmen gewonnen, so dass keine zusätzlichen Belastungen für die Kinder entstanden. Lediglich sechs Kinder und Jugendliche der Kontrollgruppe ließen sich freiwillig außerhalb diagnostischer Maßnahmen Blut entnehmen.

Das Blut wurde direkt in Ammonium-Heparin-Monovetten abgefüllt, umgehend in einem 37 °C warmen Dewar-Gefäß in das Labor transportiert und dort aufgearbeitet.

Nach Verdünnung und Bestrahlung des Vollbluts erfolgte an vier festgelegten Zeitpunkten nach der Bestrahlung die Lymphozytenseparation, dann die Färbung der Lymphozytenkerne mittels γ H2AX-Immunfluoreszenz und zu einem späteren Zeitpunkt die Auswertung der Proben.

3.2 Versuchsprotokoll

3.2.1 Materialien und Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
AcuBoy	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Brutschrank	Hera cell	Heraeus, Hanau
Deckgläser	18 mm Durchmesser	Roth, Karlsruhe
Dewar –Transportgefäß	Typ B	KGW Isotherm, Karlsruhe
Fluoreszenz-Mikroskop	Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop-Kamerasystem	DigitalCamera DXM 1200	Nikon, Düsseldorf
Objektträger	SuperFrost 76x26mm	Roth, Karlsruhe
Parafilm	IL60631	American National Can, Chicago, USA
Petrischalen		Nunc, Wiesbaden
Pipetten (0,1-2,5; 0,5-10; 2-20; 10-100; 20-200, 100-1000 µl)	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenröhre	1. MCN 165 / 796704 2. PW2 184/400	Philips, Hamburg
Schüttler	ELMI Shaker 54	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
Vortex	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
6-Well-Platten	128x86 mm	Nunc, Wiesbaden
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Tischzentrifugen	1. Biofuge fresco 2. Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Eppendorf A-4-62	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.2 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Antikörper

3.2.2.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalie/Lösung/Puffer	Hersteller
Aceton	VWR, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Formaldehyd, 37 % in PBS	VWR, Darmstadt
Gelatine	Roth, Karlsruhe
Methanol	VWR, Darmstadt
Mounting Medium (Vectashield®)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Normalserum der Ziege (NS)	PAA, Cölbe
LSM 1077 Lymphocyte	PAA , Pasching/ Österreich
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> (PBS))	PAA, Cölbe
Postfixierungs-Lösung (2,5 % (v/v) Formaldehyd in PBS)	VWR, Darmstadt und PAA, Cölbe
RPMI-Nährmedium 1640	PAA, Cölbe

3.2.2.2 Antikörper

mouse-anti- γ H2AX (Ser139) IgG, 1mg/ml	Upstate, Charlottesville, USA
goat-anti-mouse Alexa-Fluor 488® IgG, 2mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.2.3 Röntgenbestrahlung

3.2.3.1 Vorbereitung

Die 37 °C warmen Blutproben, idealerweise 8 ml pro Patient, wurden 1:2 mit auf 37 °C vorgewärmtem RPMI-Medium 1640 verdünnt. Das verdünnte Blut wurde dann auf zehn 15 ml-Zentrifugenröhrchen, etwa 2,1-2,4 ml Blut + RPMI pro Röhrchen, aufgeteilt. So erhielt man pro Patient zehn Proben, zwei als unbestrahlte Kontrollen und acht Proben, die nach Bestrahlung zur Ermittlung des DSB-Reparaturvermögens der Kinder nach vier Zeitpunkten aufgearbeitet wurden: nach 0,5 h, 2,5 h, 5 h und nach 8 h.

Der Transport aller Proben zur Röntgenröhre und zurück erfolgte in einem Dewargefäß bei 37 °C damit die Zellen am Leben blieben und nach der Bestrahlung unter optimalen Bedingungen reparieren konnten.

3.2.3.2 Bestrahlung der Proben

Die Röntgenbestrahlung zur Erzeugung von DNA-DSB fand bei Raumtemperatur statt. Vier Blutproben wurden mit 1 Gy bestrahlt, vier Proben mit 2 Gy und zwei Proben blieben, als Kontrollen, unbestrahlt.

Standen nur 3,5 - 4 ml Blut von einem Kind zur Verfügung, so wurden vier Proben mit 1 Gy bestrahlt und eine Probe diente als Kontrolle.

Für die ex vivo-Bestrahlung des verdünnten Vollbluts der beiden Untersuchungsgruppen wurden zwei verschiedene Röntgenröhren mit jeweils einer Wolfram-Anode und einem Beryllium-Austrittsfenster verwendet. Die Bestrahlung in der Röntgenröhre vom Typ MCN 165/796704 (Philips) wurde bei einer Stromstärke von 19 mA bei einer Filterung von 1 mm Aluminium und einer Spannung von 90 kV (Kilovolt) durchgeführt. Im Abstand von 30 cm zum Beryllium-Austrittsfenster lag die Dosisleistung somit bei 1,96 Gy/min. In der Röntgenröhre vom Typ PW2 184/400 (Philips) betrug die Stromstärke bei Bestrahlung 25 mA bei einer Filterung von 2 mm Aluminium und einer Beschleunigungsspannung von 90 kV. Die Dosisleistung betrug 1,23 mGy/min im Abstand von 40 cm zum Austrittsfenster. Die Dosisleistungen beider Röntgenröhren wurden mittels Fricke-Dosimetrie und durch Messungen mit einer Weichstrahlkammer (PTW, Freiburg) bestimmt.

Das verdünnte Vollblut wurde in liegenden Zentrifugenröhrchen (15 ml-Falcons), bis zu vier pro Bestrahlungsvorgang, bestrahlt. Anschließend erfolgte der Rücktransport der Proben bei 37 °C und die umgehende Inkubierung für 0,5 h, 2,5 h, 5 h und 8 h im Brutschrank in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37 °C.

3.2.4 γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Werden keine anderen Angaben gemacht, so erfolgte der entsprechende Arbeitsschritt bei Raumtemperatur.

Die unbestrahlten Kontrollproben wurden mit den beiden mit 1 und 2 Gy bestrahlten 0,5 h-Proben, die übrigen Proben nach 2,5 h, 5 h und 8 h aufgearbeitet.

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des Ficoll-Isopaque-Dichtegradienten (1,0-1,3 g/ml). Hierzu wurde nach Ablauf der Inkubationszeit etwa 2,1 - 2,4 ml der verdünnten Blutprobe unter der Sterilbank vorsichtig auf 2,2 ml Lymphozytentrennmedium (LSM 1077 Lymphocyte) aufgeschichtet und bei 1200 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren vier Phasen vorhanden: zuunterst die rote Fraktion der zellulären Blutbestandteile als Sediment, folgend die Percollphase mit Granulozyten, hierauf die weiße, dünne Lymphozytenphase und zuoberst das Blutserum (siehe Abb. 6).

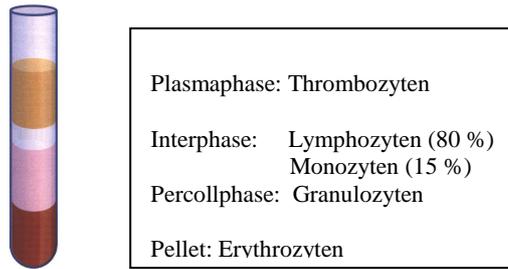


Abb. 6: Schema der Probe nach Zentrifugation mit Percollüberschichtung

Die weiße Fraktion der Lymphozyten wurde nun zu 400 µl entnommen und für 10 min in 6 ml PBS bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde nach Absaugen des PBS mit 6 ml PBS resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (240 g, 10 min). Anschließend wurde das Lymphozyten-Pellet mit 100 µl PBS aufsuspendiert, auf sterilisierte und zuvor gelatinisierte Deckgläschen in einer Feuchtekammer aufgetragen und für 10 min bei RT stengelassen. Die so separierte Zellphase, oben vereinfacht als Lymphozytenphase bezeichnet, enthält etwa 80 % Lymphozyten (60 % CD4⁺, 15 % CD8⁺ und 5 % CD19⁺), etwa 15 % Monozyten und 5 % Granulozyten (Löbrich M et al. 2005).

Monozyten und Granulozyten wurden durch morphologische Kriterien unter dem Mikroskop erkannt und nicht in die Auswertung mit einbezogen, die Analyse der Lymphozyten beinhaltete jedoch alle Lymphozyten-Subpopulationen.

Die Fixierung der Zellen erfolgte für 30 min bei -20 °C in 3 ml 100 % Methanol pro Deckgläschen, die anschließende Permeabilisierung erfolgte für 1 min bei -20 °C in 100 % Aceton. Anschließend wurden die Lymphozyten dreimal für 10 min in PBS, versetzt mit 1 % NS (PBS/NS), gewaschen.

Die fixierten Deckgläschen wurden in einer Feuchtekammer auf Parafilm ausgelegt, mit 40 µl primärer Antikörperlösung (mouse-anti-γH2AX (Ser 139), 1: 800; in PBS mit 1 % NS) überschichtet und über Nacht bei +4 °C inkubiert.

Nach mindestens 6 h Inkubationszeit des primären Antikörpers wurden die Proben auf RT gebracht, dann erfolgten verschiedene Waschschritte bei RT bis zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Zweimaliges Waschen für 10 min mit PBS/NS, sowie ein zweimaliges Waschen in PBS, einmal für 5 min und einmal für 10 min. Um die Bindung des sekundären Antikörpers zu verstärken, wurden die Deckgläschen für 15 min in PBS mit 2,5 % Formaldehyd inkubiert und danach dreimal für 10 min in PBS gewaschen.

Für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Deckgläschen wiederum auf Parafilm in einer neu angelegten Feuchtekammer ausgelegt, mit 80 µl sekundärer Antikörperlösung (goat-anti-mouse AlexaFluor 488®, 1:400 in PBS mit 1 % NS) überschichtet und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal für 10 min im Dunkeln in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Deckgläschen mit der Zellseite auf Objektträger mit 3 µl VECTASHIELD *mounting medium*, versetzt mit DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne, gelegt und bei +4 °C im Dunkeln gelagert. Vor der Auswertung der Präparate erfolgte eine Versiegelung der Deckgläschen auf den Objektträgern mit Nagellack.

3.2.5 Auswertung der γ H2AX-Foci und statistische Methoden

Zur Bestimmung der individuellen DSB-Reparaturkapazität der Kinder wurde das ex vivo-Reparaturvermögen der Lymphozyten über die Abnahme der Anzahl der γ H2AX-Foci, welche ein Maß für die Anzahl der DSB sind, bestimmt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte manuell mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse E600 (Düsseldorf) unter hundertfacher Vergrößerung eines Immersionsobjektivs. Ausgezählt wurden mindestens 80 Zellkerne und mindestens 40 Foci pro Deckglas.

Wurde das Reparaturvermögen eines Kindes mehrfach bestimmt, so stellen die angegebenen Werte die Mittelwerte aller Experimente bei diesem Kind dar, im Ergebnisteil dieser Arbeit sind hier die Standardabweichungen des Mittelwerts als Fehlerbalken dargestellt.

Zur Analyse und zum Vergleich der Ergebnisse von Tumor- und Kontrollgruppe wurden der statistische Mittelwert der Ergebnisse der Kontrollgruppe und bei jedem Kind die Standardabweichung des Mittelwerts zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung (0,5/2,5/5/8 h nach Bestrahlung) berechnet. Diese Standardabweichung diente als Referenzwert zur Entscheidung, ob ein Kind aus der Tumorgruppe eine auffallend hohe Zahl an γ H2AX-Foci aufwies. Lag die Focizahl eines Tumorkindes zu einem der Zeitpunkte über der Standardabweichung der Kontrollgruppe, so galt dies als auffälliger Wert. Waren mehr als drei Werte eines Patienten auffällig, so zählte dieses Kind zur Gruppe von Kindern mit auffällig hohen Focizahlen.

Zur Untersuchung, ob zwischen Tumor- und Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede bestehen, wurde der Mann-Whitney-U-Test mittels SPSS-Software (SPSS, Chicago, USA) auf die Daten angewendet. Als statistisch signifikant wurde ein $p \leq 0,05$ betrachtet. Bei der Verwendung von Boxplots entsprachen die Boxgrenzen dem oberen (75 %) und unteren (25 %) Quartil der Werte, der Median der Linie im Zentrum der Box.

3.3 Erfassung der strahleninduzierten Normalgewebstoxizität bei therapeutisch bestrahlten Kindern mittels der RTOG/EORTC-Kriterien

Unter Berücksichtigung der Kriterien der RTOG/EORTC wurde bei den Kindern dieser Studie, die eine Radiotherapie erhalten hatten, die maximale strahleninduzierte Normalgewebstoxizität ermittelt.

Eine Arbeitsgruppe der RTOG/EORTC entwickelte Mitte der 80er Jahre eine Einteilung für Früh- und Spätreaktionen nach Strahlentherapie.

Die hier verwendeten Schemata für Früh- und Spätfolgen nach Strahlentherapie stammen aus dem Dokumentationsprotokoll der RiSK-Studie unter Leitung von Prof. Dr. med. Willich (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Münster). Das Protokoll folgt den RTOG/EORTC-Kriterien, die Labor- und Funktionsparameter wurden jedoch an pädiatrische Normwerte angepasst.

Mittels dieser Einteilung können akute, das bedeutet bis zum 90. Tag nach Bestrahlungsbeginn, sowie chronische Strahlenfolgen separat für alle wesentlichen Organsysteme quantifiziert werden. Für Früh- und Späteffekte werden jeweils fünf Schweregrade, von 0 = kein Effekt bis 4 = lebensbedrohlicher Zustand, durch die Nebenwirkungen definiert (Tab. 1).

Akute Nebenwirkungen der Studienpatienten wurden der Aktendokumentation der wöchentlichen Untersuchungen während der Bestrahlung und der zwei Monate nach Abschluss der Strahlentherapie stattgefundenen Nachsorgeuntersuchung entnommen. Traten chronische Nebenwirkungen auf, so wurden sie in den Untersuchungsdokumentationen bei Beschwerden und bei den jährlich nach Radiatio stattfindenden Nachsorgeuntersuchungen erfasst. Operationen im Bestrahlungsgebiet und Chemotherapien wurden miterfasst.

Für die abschließende Bewertung eines Patienten wurde der höchste in einem Parameter nach den RTOG/EORTC-Kriterien aufgetretene Grad innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums herangezogen.

Grad	Allgemeine Beschreibung der Nebenwirkungen	Beispiel Lunge
0	keine	normal; pO ₂ > 85, pCO ₂ < 40
1	gering	keine oder geringe Symptome (trockener Reizhusten); geringe radiologische Zeichen (geringe Belastungsdyspnoe), pO ₂ : 71-85, pCO ₂ : 41-50
2	mäßig	mäßig symptomatische Lungenfibrose oder Pneumonitis (massiver Husten); geringes Fieber; radiologisch fleckige Veränderungen (mäßige Belastungsdyspnoe) pO ₂ : 61-70, pCO ₂ : 51-60
3	stark	ausgeprägte symptomatische Lungenfibrose oder Pneumonitis; radiologisch dichte Veränderungen (starke Ruhedyspnoe) pO ₂ : 51-60, pCO ₂ : 61-70 (intensive medikamentöse Therapie)
4	lebensbedrohlich	massive respiratorische Insuffizienz; permanente O ₂ -Gabe und kontrollierte Beatmung nötig pO ₂ < 50; pCO ₂ > 70 (intensivmedizinische Massnahmen)

Tab. 1: Einteilung chronischer Strahlenfolgen bei Kindern (RTOG/EORTC) am Beispiel der Lunge

4. Ergebnisse

4.1 Probanden

Insgesamt wurden 47 Kinder in die Pilotstudie aufgenommen, darunter 23 Kinder mit malignen Tumorerkrankungen und 24 gesunde Kinder. In der Mehrzahl der Fälle gelang es Patienten für die Studie zu gewinnen, die entweder noch keine DNA-schädigende Chemo- oder Radiotherapie erhalten hatten oder bei denen solche Therapien mehrere Monate zurücklagen. Bei fünf Kindern mit Krebserkrankung konnten, bei Auffälligkeiten in der ersten Auswertung, Zweifachbestimmungen durchgeführt werden: AITB, HNEE, LTJE, SSCL und WLLA.

Die Patientendaten dieser Arbeit wurden aus den Akten der Kinderklinik, bei radiotherapierten Kindern auch aus den Akten der Klinik für Strahlentherapie, bis zum Abschluss der Laboruntersuchungen im Mai 2008 erhoben. Die Charakteristika der 23 krebserkrankten Kinder sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

In die Tumorgruppe wurden fast alle Arten solider kindlicher Tumoren eingeschlossen, trotz der kleinen Patientenzahl zeigt sich hier eine relativ typische Verteilung der Häufigkeiten der soliden Tumorarten im Kindesalter (Tab. 2). Zu beachten ist, dass Patienten mit Leukämien ausgeschlossen wurden, da proliferierende Lymphoblasten die Ergebnisse möglicherweise verfälscht hätten. Die meisten Patienten waren an einem Hirntumor erkrankt, sechs an nichtembryonalen Hirntumoren, drei weitere an einem Medulloblastom. In absteigender Häufigkeit folgten Weichteil- oder Knochensarkome, embryonale Tumoren und andere Malignome.

Das Kind HNEE mit einem Verdacht auf ein Beckwith-Wiedemann-Syndrom erkrankte an vier Malignomen: einem Nebennierenrindenzarzinom, einem Rhabdomyosarkom, einem Nephroblastom und einem nicht mehr diagnostizierten Viertumor im Abdomen.

TUMORART	ANZAHL	PATIENTEN
<u>EMBRYONALE TUMOREN</u>	7	
Medulloblastom	3	LNEY, STFO, VTEE
Nephroblastom	2	HNEE, MRCE
Neuroblastom	2	HNLS, WLLA
<u>SARKOME</u>	7	
Chondrosarkom	1	BHJA
Desmoplastischer Rundzelltumor	1	LTJE
Klarzellsarkom	1	TDJY
Osteosarkom	2	KZBA ,YASR
Rhabdomyosarkom	1	HNEE
Synovialsarkom	1	CRDL
<u>HIRNTUMOREN</u>	6	
Astrozytom	4	KNNA,NSNE, SAAO, SSCL
Glioblastoma multiforme	1	AITB
Pongliom	1	MRSA
<u>ANDERE</u>	5	
Juveniler Granulosazelltumor	1	KKKA
Malignes Teratom	1	SRKN
Morbus Hodgkin	2	AAEA, PNSH
Nebennierenrindencarzinom	1	HNEE

Tab. 2: Tumorarten des Patientenkollektivs

Von den 47 untersuchten Kindern gehörten 24 den gesunden Kindern der Kontrollgruppe an. Hiervon waren 14 Kinder männlichen und 10 Kinder weiblichen Geschlechts, die Geschlechtsverteilung betrug $m : w = 1,4$.

Zur Tumorgruppe gehörten 23 Kinder, 9 Jungen und 14 Mädchen, die Geschlechtsverteilung lag bei $m : w = 0,64$.

Das mittlere Alter aller Tumorpatienten zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug 10,5 Jahre, ohne die 21jährige Patientin KZBA 9,9 Jahre, das der Kontrollgruppe 9,7 Jahre.

Das durchschnittliche Alter der tumorkranken Kinder bei Diagnosestellung war 7,8 Jahre (Minimum 1 Jahr und 10 Monate, Maximum 17 Jahre und 5 Monate). Ausgenommen davon ist die Probe KZBA, hierbei handelt es sich um das Auftreten eines kindlichen Tumors im Alter von 21 Jahren und 4 Monaten.

Von den 23 Tumorpatienten verstarben drei im Untersuchungszeitraum:

LNEY starb 12 Monate nach Erstdiagnose eines Medulloblastoms und Feststellung einer Fanconi-Anämie im Alter von 5 Jahren und 2 Monaten an einer Nekrose des gesamten Myelons ungeklärter Ursache; zu vermuten bleibt hier eine Spätfolge der ZNS-schädigenden Radio- und Chemotherapie.

Im Alter von sechs Jahren starb HNEE am Progress eines nicht mehr diagnostizierten Viertumors im Unterbauch, drei Jahre nach der Diagnosestellung des Ersttumors.

Vierzehn Monate nach Diagnose eines anaplastischen Astrozytoms verstarb NSNE mit 8 Jahren und 3 Monaten an Tumorprogress und dem daraus resultierenden erhöhten Hirndruck.

ID	Geschlecht	Alter bei Diagnose (J.)	Tumorart	Tumorprädisposition	DNA-schädigende Chemotherapeutika	chemoinduzierte Nebenwirkungen	Strahlentherapie (Gy)	strahleninduzierte Nebenwirkungen	abnorme DSB-Reparatur
AAEA	m	13	Morbus Hodgkin	---	CPM, DOX, PCB, VP-16		---	---	---
AITB	m	9	Glioblastom	Turcot-Syndrom, homozygote <i>PMS2</i> - Mutation	CCNU, TMZ		59.4 (1 x 1.8/d)	Grad 2 (Haut)	leicht auffällig
BHJA	w	12	Chondrosarkom	---	DACT, DOX, IDA, IFO, TFF, VP-16	Fieber in Aplasie	50.4 (1 x 1.8/d)	Grad 0	---
CRDL	m	9	Synovialsarkom	---	DACT, DOX, IFO		44.8 (1 x 1.6/d)	Grad 0	---
HNEE	w	2 3 5	NNR-Karzinom Rhabdomyosarkom Nephroblastom	multiple Malignome Beckwith-Wiedemann-Syndrom?	DOX, IFO		36.0 (1 x 1,8/d) 15.0 (1 x 1.5/d)	Grad 3 (Lunge) Strahlenpneumonitis	auffällig
HNLS	m	3	Neuroblastom	---	CDDP, DOX, DTIC, IFO, VP-16		---	---	---
KKKA	w	16	Granulosazelltumor	---	CDDP, IFO, VP-16		---	---	---
KNNA	w	12	Astrozytom	---	---		---	---	---
KZBA	w	21	Osteosarkom	---	CDDP, DOX, IFO, MTX, VP-16		---	---	---
LTJE	w	6	desmoplastischer Rundzelltumor	---	CBDCA, CPM, IDA, TFF, TOPO, VP-16		55.8 (1x 1.8/d)	Grad 1 (Haut)	---
LNEY	w	4	Medulloblastom	Fanconi-Anämie, Subtyp FA-N, <i>PALB2</i> -Mutation	CPM, MTX (intrathekal)	verlängerte Aplasie mit Sepsis Grad 4 Nekrose des RM	54.0 (1 x 1.8/d)		auffällig
MRSA	w	6	Ponsgliom	---	---		54.0 (1 x 1.8/d)	Grad 1 (Haut)	---
MRCE	w	4	Nephroblastom	---	DACT, DOX		---	---	---
NSNE	w	7	Astrozytom	---	CCNU, CDDP, IFO, MTX, VP-16		59.4 (1 x 1.8/d)	Grad 2 (Haut)	---

PNSH	w	17	Morbus Hodgkin	---	BLM, DOX, DTIC, IFO, Vincristin-assoziierte PCB, VP-16	Neuropathie	30.6 (1 x 1.8/d)	Grad 0	---
SAAO	m	6	Astrozytom	---	CPM, CBDCA,	verlängerte MTX-	---	---	---
STFO	m	9	Medulloblastom	---	MTX (intrathekal + i.v.), VP-16	Clearance	60.0 + 40.0 + 45.0 (2 x 1.0/d)	Grad 1 (Haut, Schleimhaut, GI-Trakt)	---
SRKN	w	16	malignes Teratom	---	CBDCA, CDDP, IFO, CPM, VP-16		---	---	---
SSCL	w	2	Astrozytom	---	CBDCA, CDDP, CPM	Carboplatin-Allergie Grad 2-3	---	---	auffällig
TDJY	w	4	Klarzellsarkom	---	IFO, VP-16		30.0 (1 x 1.5/d)	Grad 0	---
					CBDCA, CPM		30.4 (1 x 1.8/d)	Grad 2 (GI-Trakt)	
							36.0+30.6 (1x 1.8/d)	Grad 0	
							15.0 (1 x 1.5/d) (ganze Lunge)	Grad 0	
VTEE	m	1	Medulloblastom	---	CBDCA, CPM, MTX (intrathekal)	Fieber in Aplasie	30.4 (1 x 1.6/d)	Grad 0	---
WLLA	m	2	Neuroblastom	---	CBDCA, CDDP, CPM, DOX, L-PAM		36.0 (1 x 1.8/d)	Grad 0	---
YASR	m	12	Osteosarkom	---	TOPO, VP-16				
					CDDP, DOX, IDA, IFO, MTX, TFF,	Nierenfunktions-beeinträchtigung	15.0 (1 x 1.5/d) (ganze Lunge)	Grad 2 (Lunge)	---

Tab. 3: Charakteristika der TuKi

Abkürzungen: J.=Jahre; d=day m=männlich; w=weiblich; CPM=Cyclophosphamid; DOX=Doxorubizin; PCB=Procarbazin; VP-16=Etoposid; CCNU=Lomustin; TMZ=Temozolomid; DACT=Actinomycin; IDA=Idarubizin; IFO=Ifosfamid; TFF=Trofosfamid; CDDP=Cisplatin; DTIC=Dacarbazin; CBDCA=Carboplatin; BLM=Bleomycin; MTX=Methotrexat; L-PAM=Melphalan; TOPO=Topotecan; GI=gastrointestinal; Rot hinterlegt: in der Auswertung auffällige TuKi.

4.2 Untersuchung der DNA-Doppelstrang-Reparaturkapazität mittels γ -H2AX-Immunfluoreszenz

Abbildung 7 zeigt die DAPI-gefärbten Lymphozytenkerne mit γ H2AX-Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop.

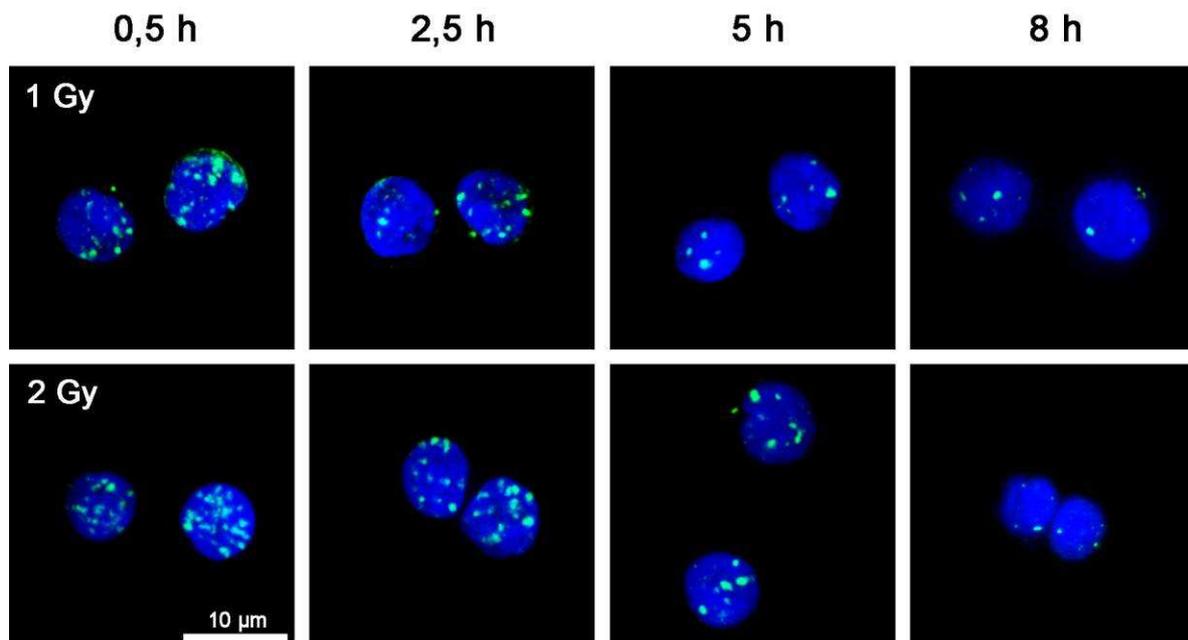


Abb. 7: γ H2AX-Foci in kindlichen Lymphozyten nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy nach 0,5 h, 2,5 h, 5 h und 8 h, Grundfärbung DAPI

4.2.1 Statistische Auswertung

Die Focizahlen pro Lymphozyt lagen nach 0,5 h und 2,5 h Reparaturzeit in Tumor- und Kontrollgruppe in jeweils ähnlichen Bereichen. Der Mittelwert der TuKi 0,5 h nach Bestrahlung mit 1 Gy lag bei 9.6 ± 0.09 (\pm Standardfehler (SE)), der Mittelwert der Kontrollkinder (KoKi) bei 9.4 ± 0.08 (\pm SE) Foci pro Zelle. Nach 2 Gy-Bestrahlung lagen die Werte nach 0,5 h bei 16.8 ± 0.22 (TuKi) und 17.16 ± 0.19 (KoKi) (siehe Abb. 8).

Signifikante Erhöhungen der Focizahlen im Sinne einer defizienten DSB-Reparatur konnten erst bei längeren Reparaturzeiten wie 5 und 8 h gesehen werden.

Die mittlere Focizahl pro Zelle aller TuKi lag nach 8 h Reparaturzeit signifikant höher (1 Gy: 2.2 ± 0.1 ; 2 Gy: 3.8 ± 0.2 (\pm SE)), als der Mittelwert der Kontrollgruppe nach 8 h (1 Gy: 1.8 ± 0.1 , $p \leq 0.017$; 2 Gy: 2.8 ± 0.2 , $p \leq 0.001$) (Abb. 8).

Diese Werte blieben bei 2 Gy-Bestrahlung nach 8 h in der Tumorgruppe sogar signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wenn man vier Kinder mit den auffällig hohen Focizahlen (AITB, HNEE, LNEY und SSCL), wie in den Abbildungen 8 und 9 zu sehen, bei der Auswertung nicht berücksichtigte ($p \leq 0,003$).

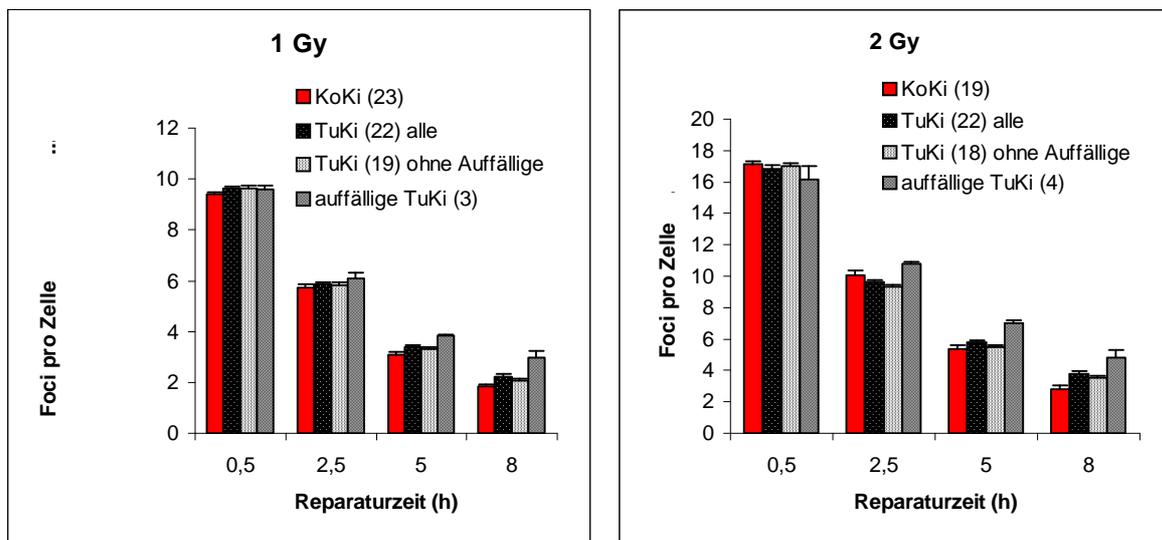


Abb. 8: Vergleich der Mittelwerte von Kontrollgruppe, Tumorgruppe und auffälligen TuKi bei 1 Gy und 2 Gy, die Fehlerbalken entsprechen dem SE

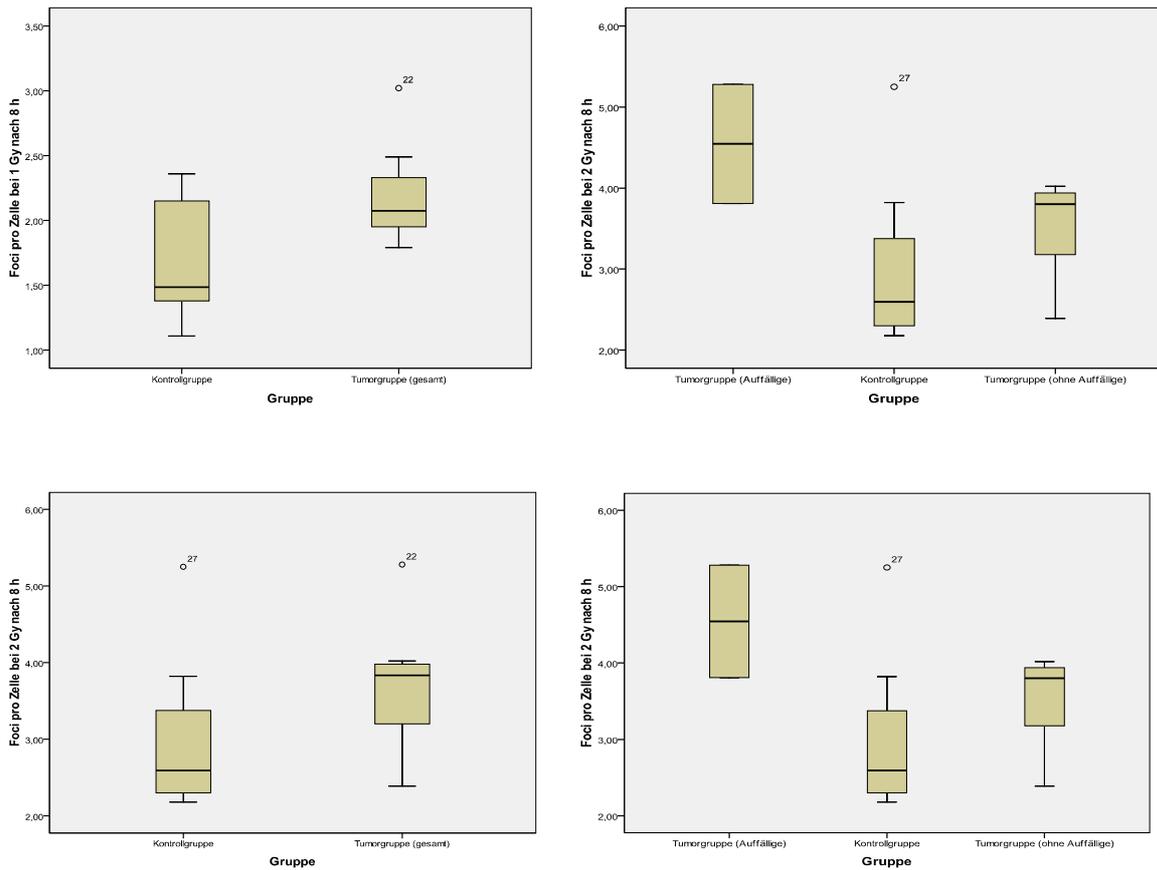


Abb. 9: Vergleich der Mittelwerte von Tumorgruppe, auffälligen Kindern der Tumorgruppe und Kontrollgruppe nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy nach 8 h Reparaturzeit

Darüber hinaus wurde die durchschnittliche spontane Rate an γ H2AX-Foci, die γ H2AX-Hintergrundfluoreszenz, durch die Auswertung unbestrahlter Proben ermittelt. Sie lag bei der Tumorgruppe im Mittel signifikant höher als bei den gesunden Kindern ($0,095 \pm 0,014$ vs. $0,053 \pm 0,005$ (\pm SE); $p \leq 0,0016$) (Abb. 10).

Die spontane Rate an γ H2AX-Foci blieb bei den TuKi weiterhin signifikant höher ($p \leq 0,003$), wenn die vier TuKi mit auffällig hohen Focizahlen aus der Berechnung eliminiert wurden (Abb. 11).

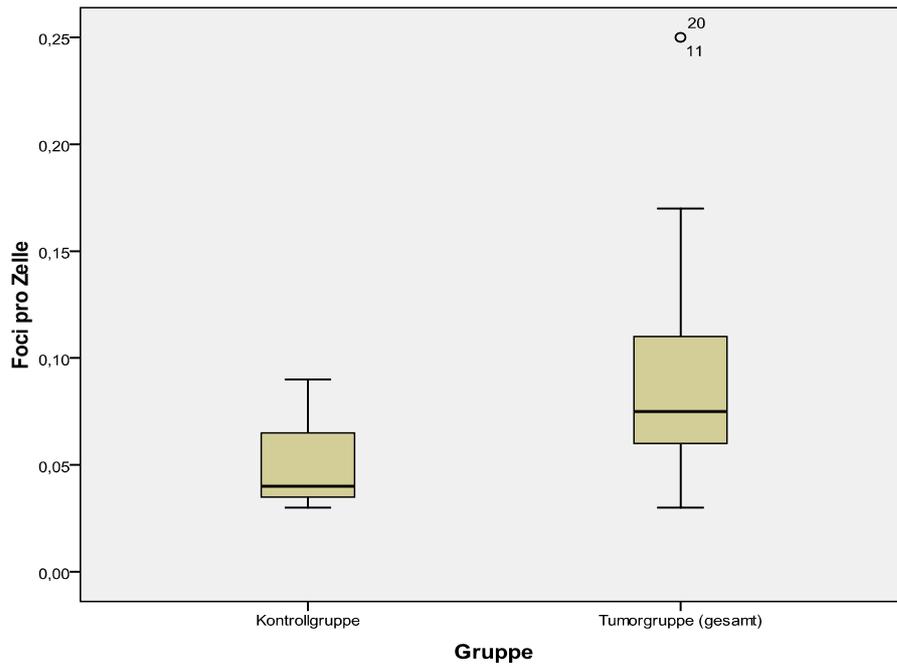


Abb. 10: Vergleich der Mittelwerte der unbestrahlten Proben von Kontroll- und Tumorgruppe

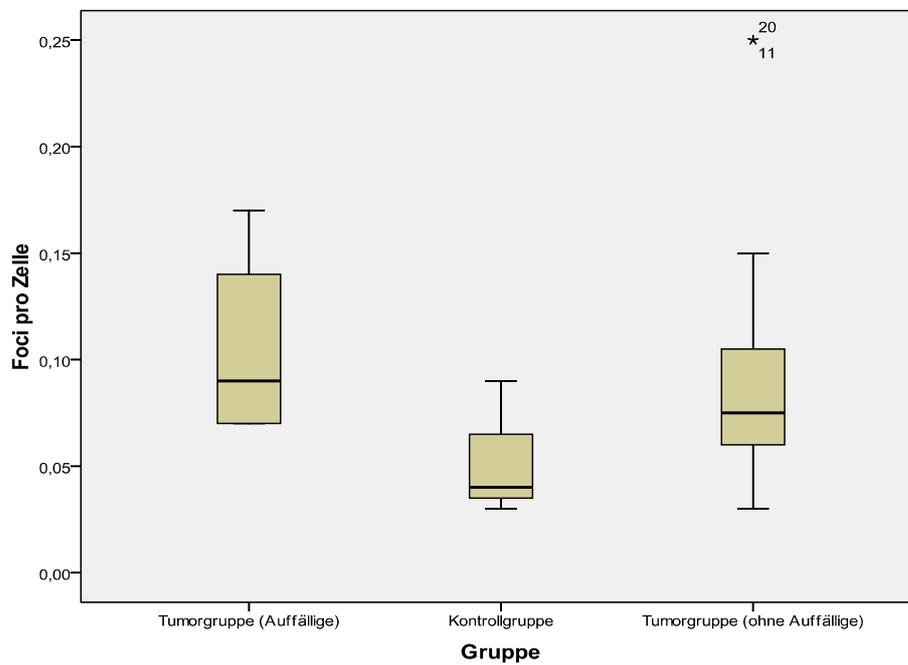


Abb. 11: Vergleich der Mittelwerte der unbestrahlten Proben von Kontrollgruppe, Tumorgruppe ohne auffällige Kinder und auffällige Kinder der Tumorgruppe

Die Focizahlen der unbestrahlten Proben wurden bei jedem Kind von den Focizahlen der bestrahlten Proben abgezogen, um die Hintergrundstrahlung zu eliminieren und die tatsächliche DSB-Reparaturfähigkeit pro Zeiteinheit zu messen.

Als Kriterium auffällig hoher Focizahlen eines Kindes galt, an drei von vier Zeitpunkten nach der Bestrahlung, also dem 5- und 8-h-Punkt bei 1 und 2 Gy, mit der Focizahl über dem Mittelwert plus der Standardabweichung der Kontrollgruppe zu liegen (über den Rechtecken in den Abbildungen 12 und 13).

Kein Kind der Kontrollgruppe zeigte auffällige Focizahlen im Sinne einer mangelhaften DSB-Reparaturfähigkeit.

In der Tumorgruppe fanden sich jedoch vier Kinder mit soliden Tumoren (AITB, HNEE, LNEY und SSCL; farbig hinterlegt in Tab. 3), die signifikant erhöhte Focizahlen nach 5 und 8 h aufwiesen (Abb. 8, 12 und 13). Im Mittel zeigten diese auffälligen Kinder nach 8 h (1 Gy: 3.0 ± 0.3 ; 2 Gy: 4.8 ± 0.5 (\pm SE)) um ein oder zwei Foci erhöhte Werte im Vergleich zum mittleren Wert der Kontrollgruppe nach 8 h (1 Gy: 1.8 ± 0.1 , $p \leq 0.008$; 2 Gy: 2.8 ± 0.2 , (\pm SE) $p \leq 0.013$). In dieser Betrachtungsweise stellte sich das Signifikanzniveau nach 5 h mit $p \leq 0.026$ nach 1 Gy Bestrahlung und $p \leq 0.002$ nach 2 Gy dar.

In den Abbildungen 12 und 13 sind die Werte dieser vier Kinder in bunten Balken gehalten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Kinder, bei denen eine Zweifachbestimmung möglich war. Von LNEY existiert wegen nur gering vorhandener Blutmenge bei der Untersuchung für die Studie, anschließender Radiotherapie und baldigem Tod des Kindes nur der eindeutig auffällige 2Gy5h-Wert (Abb. 13). In Zusammenschau der weiteren Eigenschaften des Kindes, wie in 4.3 beschrieben, konnten wir es jedoch zu den auffälligen Kindern hinzurechnen.

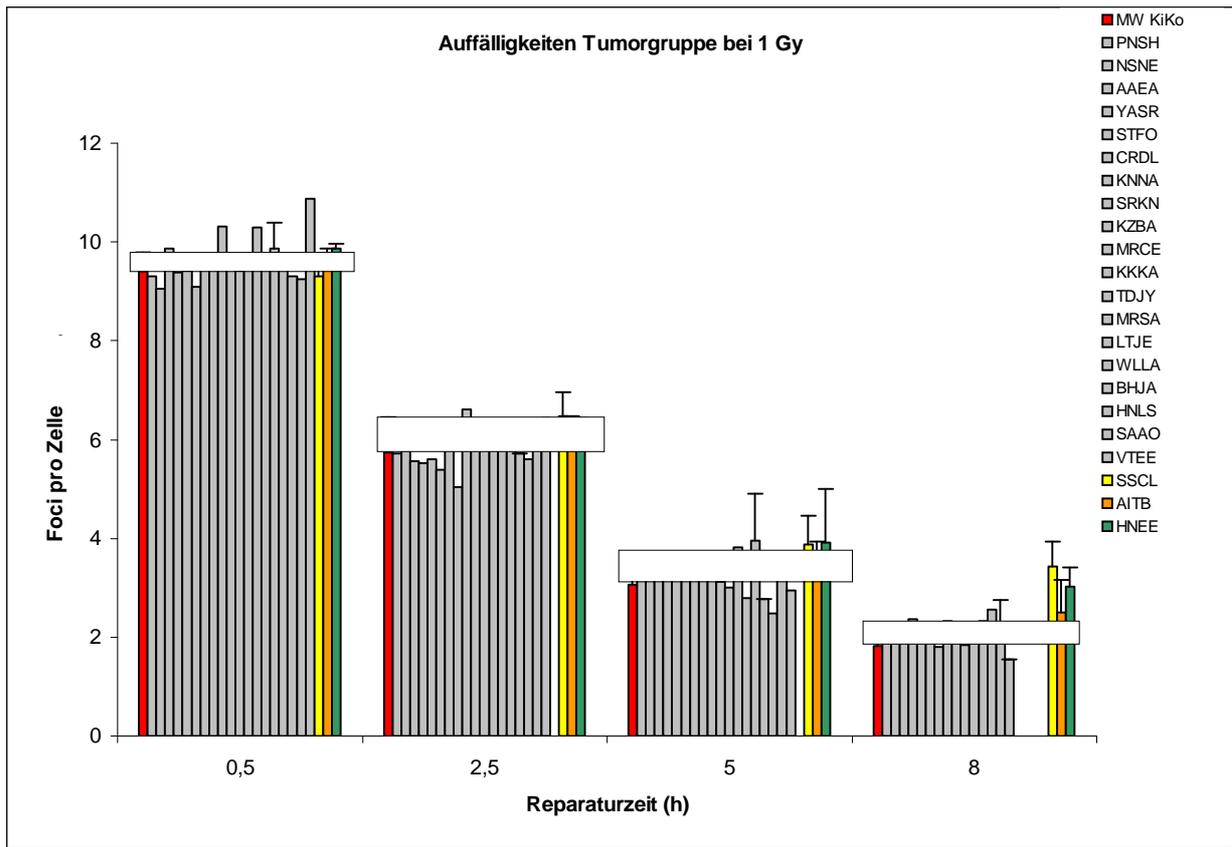


Abb. 12: Vergleich des Mittelwerts plus Standardabweichung der Focizahlen der KoKi (Rechteck) mit den Einzelwerten der TuKi nach Bestrahlung mit 1 Gy.

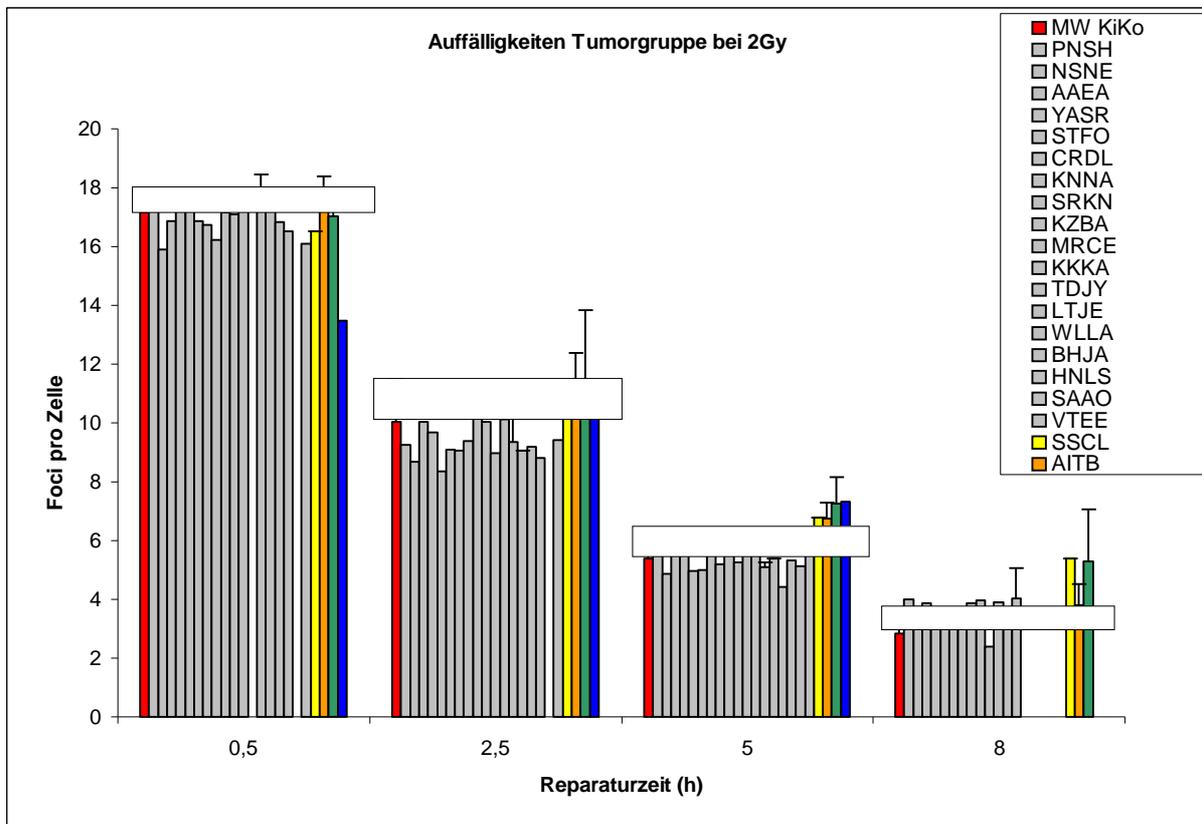


Abb. 13: Vergleich des Mittelwerts der Focizahlen plus Standardabweichung der KoKi (Rechteck) mit den Einzelwerten der TuKi nach Bestrahlung mit 2 Gy.

4.3 Auffällige Patienten

In den folgenden Abschnitten werden die vier auffälligen Kinder der Tumorgruppe (Abb. 12 und 13) genauer beschrieben, da der klinische Verlauf und die individuellen Eigenschaften jedes dieser Kinder mit seiner schlechteren DSB-Reparaturfähigkeit korreliert.

Der Patient AITB war zum Untersuchungszeitpunkt ein neun Jahre alter Junge, bei dem bereits vor der Diagnose des Glioblastoms eine Variante des Turcot-Syndroms, verursacht durch eine homozygote Mutation im DNA-MMR-Gen PMS2 (Exon 11:c.1768delA) bekannt war. Zwei Geschwister des Kindes, die die gleiche homozygote PMS2-Mutation aufwiesen, waren bereits an einem Glioblastom verstorben (Gottschling S et al. 2008). Als Folge seiner Strahlentherapie litt AITB lediglich unter moderaten Hautreaktionen, nicht unter schwerwiegenderen Radiotoxizitäten des Normalgewebes (Tab. 4). Diese weniger hohe klinische Strahlenempfindlichkeit korreliert gut mit seinen, im Vergleich zu den anderen auffälligen Kindern, geringer erhöhten Focizahlen.

HNEE war ein - als zweieiiger Zwilling - nach in vitro-Fertilisation geborenes Mädchen, das schon in früher Kindheit multiple Malignome entwickelt hatte: mit zwei Jahren ein Nebennierenrindenzarzinom, mit drei Jahren ein Rhabdomyosarkom und mit fünf Jahren ein pulmonal metastasiertes Nephroblastom, sowie kurze Zeit später ein histologisch nicht mehr abgeklärter Tumor im unteren Abdomen. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Konstellation vermutete man ein Tumorprädispositionssyndrom bei HNEE. Eine humangenetische Untersuchung auf das Li-Fraumeni-Syndrom, eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die mit multiplen Malignomen im frühen Kindesalter einhergeht, verursacht durch Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen p53, blieb ohne pathologischen Befund. Aufgrund des Phänotyps des Kindes, einhergehend mit einer Makroglossie, wurde anschließend auf das Beckwith-Wiedemann-Syndrom getestet. Hierbei konnte keine der bekannten genetischen Ursachen für dieses Syndrom gefunden werden. Das Mädchen erhielt wegen den Lungenmetastasen des Nephroblastoms eine Ganzlungenbestrahlung von insgesamt 15 Gy. Die Patientin entwickelte zwei Monate später eine schwere radiogene Pneumonitis, welche mit Glukokortikoiden und Sauerstoffgabe behandelt werden musste. Das Kind starb im Alter von fünf Jahren an einem histologisch nicht mehr untersuchten Tumor im unteren Abdomen.

Die Patientin LNEY erkrankte im Alter von vier Jahren an einem desmoplastischen Medulloblastom. Wegen auffälliger Dymorphiezeichen wie Mikrozephalie, Mikrophthalmie, geringem Augenabstand, Mikrognathie und Wachstumsverzögerung vermutete man im Verlauf das Vorliegen einer Fanconi-Anämie. Im Rahmen des ersten Chemotherapiezyklus mit systemischer Gabe von Cyclophosphamid trat eine verlängerte Aplasie mit septischem Verlauf auf. Wegen dieser schwerwiegenden Überreaktion und dem Verdacht der Fanconi-Anämie wurde das Therapieprotokoll modifiziert: Methotrexat wurde zunächst intrathekal appliziert, später lumbal wegen einer Schwellung von Hirngewebe um den Rickham-Katheter. Radiotherapeutisch erfolgte ausschließlich eine dosisreduzierte Bestrahlung des Tumorbetts in der Fossa posterior. Auf die simultane Bestrahlung der kraniospinalen Achse wurde wegen möglicher knochenmarkstoxischer Nebenwirkungen bei Fanconi-Anämie verzichtet. Drei Monate nach Ende der Radiotherapie entwickelte LNEY eine akute Paraparese ohne Meningismus oder Fieber. Liquor- und Blutuntersuchungen ergaben keinen pathologischen Befund, die Bildgebung mittels Computertomographie und Magnetresonanztomographie zeigte jedoch eine akute Nekrose des Rückenmarks ohne spinale oder meningeale Tumordissemination. Trotz intensivtherapeutischer Maßnahmen folgte ein Progress der neurologischen Symptome bis zur schlaffen Quadriparese und das Kind starb zwei Tage nach Beginn der neurologischen Symptome an respiratorischer Paralyse. DNA-Analysen im Rahmen humangenetischer Untersuchungen ergaben bei LNEY eine biallele Mutation im PALB2-Gen (2393_2394insCT; 3350+4A→G), was einen neuen Subtyp, FA-N, der Fanconi-Anämie darstellte und bereits veröffentlicht wurde (Reid S et al. 2007).

Das Mädchen SSCL war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines pilozytischen Astrozytoms zwei Jahre alt. Wegen schwerwiegender neurologischer Befunde mit armbetonter Ataxie und Hemiparese links verzichtete man auf eine ausgedehnte neurochirurgische Therapie. Die Patientin entwickelte ungewöhnlich früh eine ausgeprägte allergische Reaktion dritten Grades auf Carboplatin mit schwerem Bronchospasmus und Urtikaria. Wegen des Auftretens dieser Hypersensitivitätsreaktion erhielt die Patientin eine alternative Konsolidierungstherapie und aufgrund des Alters keine Radiotherapie. Demzufolge konnten bei SSCL keine strahleninduzierten Normalgewebstoxizitäten ermittelt werden.

4.4 Korrelation der strahleninduzierten Normalgewebstoxizität mit der individuellen DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die strahleninduzierte Normalgewebstoxizität der radiotherapierten Kinder anhand der Krankenakten der Kinderklinik und der Klinik für Strahlentherapie unter Berücksichtigung der Kriterien der RTOG/EORTC ermittelt.

Von den 23 Kindern mit Krebserkrankung wurden 13 im Verlauf ihrer Therapie mit kurativem Ansatz bestrahlt (Tab. 4). Im Rahmen der primären Tumorthherapie wurden zwölf Kinder bestrahlt, hiervon wurde ein Kind (WLLA) einmal und ein Kind viermal (TDJY) im Rahmen von Rezidivbehandlungen nochmals radiotherapiert. Ein Kind (LTJE) wurde erstmals im Rahmen einer Rezidivtherapie bestrahlt.

Neben der Radiotherapie wurde bei zwölf Patienten eine Chemotherapie mit DNA-schädigenden Agenzien durchgeführt, eine Patientin (MRSa) erhielt lediglich simultan Nimotuzumab. Sieben Patienten erhielten vor, während und nach der Bestrahlung eine Chemotherapie (BHJA, HNEE, LTJE, NSNE, YASR, STFO, TDJY).

Ein Patient (AITB) bekam während und nach, ein Patient (WLLA) vor und während der Radiatio eine Chemotherapie. Bei drei Patienten (CRDL, LNEY, PNSH) wurde vor der Bestrahlung eine Chemotherapie durchgeführt.

ID	Tumorprädisposition	Tumorart	Dosis (Gy)	Strahlenfeld	Toxizität nach RTOG/EORTC	abnorme DSB-Reparatur
1	AITB Turcot-Syndrom, homozygote <i>PMS2</i> - Mutation	Glioblastom	59.4 (1 x 1.8/d)	Teilhirn: Zentralregion links	Grad 2 (Haut)	leicht auffällig
2	BHJA ---	Chondrosarkom	50.4 (1 x 1.8/d)	BWK 10-12	Grad 0	---
3	CRDL ---	Synovialsarkom	44.8 (1 x 1.6/d)	Oberschenkel links latero-proximal	Grad 0	---
4	HNEE multiple Malignome V.a. Beckwith- Wiedemann-Syndrom	NNR-Karzinom Rhabdomyosarkom Nephroblastom	15.0 (1 x 1.5/d)	ganze Lunge (Filiae)	Grad 3 (Lunge)	auffällig
5	LTJE ---	desmoplastischer Rundzelltumor	55.8 (1x 1.8/d)	rechts paravertebral	Grad 1 (Haut)	---
6	LNEY Fanconi-Anämie, Subtyp FA-N, <i>PALB2</i> -Mutation	Medulloblastom	54.0 (1 x 1.8/d)	hintere Schädelgrube	Grad 4 ?	auffällig
7	MRSA ---	Ponsgliom	54.0 (1 x 1.8/d)	erweiterte Tumorregion,	Grad 1 (Haut)	---
8	NSNE ---	Astrozytom	59.4 (1 x 1.8/d)	Thalamus beidseits	Grad 2 (Haut)	---
9	PNSH ---	Morbus Hodgkin	30.6 (1 x 1.8/d)	beidseits zervikal, supra- klavikulär, mediastinal, hilär rechts	Grad 0	---
10	STFO ---	Medulloblastom	60.0 + 40.0 + 45.0 (2 x 1.0/d)	hintere Schädelgrube und kraniospinale Achse	Grad 1 (Haut, Schleim- haut, GI-Trakt)	---
11	TDJY ---	Klarzellsarkom	30.0 (1 x 1.5/d) 30.4 (1 x 1.8/d) 36.0+30.6 (1x 1.8/d)	Bereich M.erektor trunci Höhe SWK1/SWK2 Teilhirn	Grad 0 Grad 2 (GI-Trakt) Grad 0	---
			15.0 (1 x 1.5/d)	ganze Lunge	Grad 0	
			30.4 (1 x 1.6/d)	Acetabulum links	Grad 0	
12	WLLA ---	Neuroblastom	36.0 (1 x 1.8/d)	interaortokaval	Grad 0	---
13	YASR ---	Osteosarkom	15.0 (1 x 1.5/d)	ganze Lunge (Filiae)	Grad 2 (Lunge)	---

Tab. 4: Strahlentherapie und Normalgewebstoxizitäten der Tumorgruppe

Die Ermittlung von Früh- und Spätfolgen der Strahlentherapie erfolgte strukturiert anhand der Protokolle der RiSK-Studie.

Von 13 strahlentherapierten Kindern erlitten drei schwerere Radiotoxizitäten ab Grad III, vorwiegend betreffend den Allgemeinzustand, die Haut und Schleimhaut, die Lunge, den Gastrointestinaltrakt und das zentrale Nervensystem (Tab. 5).

Grad	Patientenzahl	ID
0	3	BHJA, CRDL, WLLA
I	4	LTJE, MRSA, PNSH, STFO
II	3	AITB, NSNE, TDJY
III	2	YASR, HNEE
IV	1	LNEY

Tab. 5: Radiotoxizität der strahlentherapierten Kinder (akute und chronische Nebenwirkungen nach RTOG/EORTC), rot: Kinder mit auffälliger DSB-Reparatur

Von den vier Kindern, die im Rahmen dieser Studie mit einer eingeschränkten DSB-Reparaturfähigkeit auffällig wurden, erhielten drei eine Strahlentherapie. Ein Kind mit leicht auffälliger DSB-Reparaturkapazität (AITB) erlitt moderate Nebenwirkungen (Grad II) an der Haut im Bestrahlungsfeld. Das Kind wurde wegen eines Glioblastoms links präzentral mit 59,4 Gy Gesamtdosis bestrahlt und erhielt simultan Temozolomid, anschließend eine Konsolidierungstherapie in Anlehnung an das HIT-GBM-D-Protokoll (Therapieoptimierungsstudie für maligne Gliome) mit Temodalblöcken in Kombination mit wöchentlicher Vincristin-Gabe.

Zwei von drei strahlentherapierten Kindern mit defizienter DSB-Reparatur in unserer Untersuchung entwickelten hochgradige Normalgewebstoxizitäten nach der radio- und chemotherapeutischen Behandlung. HNEE entwickelte eine lebensbedrohliche radiogene Grad III–Pneumonitis nach Bestrahlung von Nephroblastometastasen der Lunge mit einer Gesamtdosis von 15 Gy. Das Kind LNEY starb an einer Nekrose des Rückenmarks, dreieinhalb Monate nach Ende einer Radiatio der hinteren Schädelgrube bei desmoplastischem Medulloblastom. Auf die sonst übliche Bestrahlung der kraniospinalen Achse bei diesem Krankheitsbild war wegen der Fanconi-Anämie des Kindes verzichtet worden, jedoch könnte die vaskuläre Versorgung des ZNS distal des Bestrahlungsfeldes in

Mitleidenschaft gezogen worden sein und dies könnte, in Zusammenschau mit der zuvor erfolgten intrathekalen Chemotherapie, zu dieser schwerwiegenden Therapiefolge geführt haben.

Zusammengefasst zeigte ein Kind mit etwas auffälliger DSB-Reparatur moderate Normalgewebstoxizitäten und zwei von drei Kindern mit defizienter DSB-Reparatur entwickelten schwerwiegende Nebenwirkungen nach Behandlung mit DNA-schädigenden Therapeutika.

5. Diskussion

5.1 Bedeutung der eingeschränkten DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturfähigkeit für die Strahlentoxizität im Kindesalter

Die großen Fortschritte der multimodalen Therapiekonzepte in der pädiatrischen Onkologie führten in den letzten Jahren zu verbesserten Überlebenschancen der betroffenen Kinder. Da mit der Bekämpfung von Tumorgewebe gleichzeitig die Gefahr der Schädigung von Normalgewebe und sich den daraus ergebenden Komplikationen besteht, gibt es jedoch auch wachsende Bedenken gegen die Ausweitung dieser komplexen, oft DNA-schädigenden Therapiestrategien.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Pilotstudie Kinder mittels der etablierten γ H2AX-Immunfluoreszenzmethode untersucht, um Patienten mit einer auffälligen DSB-Reparatur als entscheidendem Faktor für hochgradige Normalgewebstoxizitäten zu ermitteln. Die individuelle DSB-Reparaturfähigkeit von Kindern mit verschiedenen, vorwiegend soliden, Malignomen wurde ermittelt und mit einer Gruppe gesunder Kinder zur Kontrolle verglichen. Alle Kinder der Kontrollgruppe zeigten eine kompetente DNA-DSB-Reparatur, die Focizahlen nach Bestrahlung mit 1 und 2 Gy blieben unauffällig. Drei von 23 Kindern der Tumorgruppe jedoch boten eine eindeutig beeinträchtigte DSB-Reparaturkapazität mit erhöhten Focizahlen nach 5 und 8 h Reparaturzeit. Teilweise konnten bei diesen auffälligen Kindern genetisch bedingte Erkrankungen nachgewiesen werden. Weiterhin fiel bei der Korrelation der individuellen Reparaturfähigkeit der radiotherapierten Kinder mit ihren Normalgewebstoxizitäten auf, dass keines der reparaturkompetenten Kinder eine Toxizität über Grad II gezeigt hatte. Dagegen erlitten zwei der reparaturdefizienten Kinder unerwartet schwere Nebenwirkungen nach Radio- und Chemotherapie: Eine Patientin bekam eine lebensbedrohliche Strahlenpneumonitis (HNEE) und ein Kind starb an einer Nekrose des Rückenmarks (LNEY).

Ein weiteres Kind (AITB) zeigte eine etwas leichter eingeschränkte DSB-Reparaturfähigkeit. Bei der Methode der manuellen Focizählung am Mikroskop, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, kann die γ H2AX-Immunfluoreszenz-Methode jedoch auch eine geringfügig eingeschränkte DSB-Reparatur eines Individuums aufdecken, dies wurde an heterozygoten Mitgliedern von Familien mit AT gezeigt (Rübe CE et al. 2010).

Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die hier verwendete Methode neue Möglichkeiten bieten kann, Kinder mit hohem Risiko für schwerwiegende Normalgewebs-

toxizitäten schon vor Beginn einer entsprechenden Therapie zu detektieren und die Therapieprotokolle gerade im Bereich der Strahlentherapie entsprechend anzupassen.

5.2 Bedeutung der eingeschränkten DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturfähigkeit für die Tumorentstehung im Kindesalter

Über die tatsächlichen Ursachen der Krebsentstehung bei Kindern ist bislang noch wenig bekannt. Lange Zeit wurden verschiedene Umwelttoxine, die noch vor der Konzeption auf die Keimzellen der Eltern, während der Schwangerschaft auf den Fetus oder postpartal auf das Kind einwirken, als wichtige Faktoren für Krebs bei Kindern angesehen (Wigle DT et al. 2008). Nachgewiesen ist, dass durch Genmutationen verursachte Fehler im Aufbau von Proteinen, die an der Zellantwort nach DNA-Schädigung mitwirken, eine wichtige Rolle bei der individuellen Tumorprädisposition spielen (Chen P et al. 2008, Kennedy RD & D'Andrea AD 2006, Li D et al. 2009, Sehl ME et al. 2009). Patienten mit Syndromen, bei denen die genomische Integrität durch Mutationen gestört ist und die mit vorzeitiger Alterung oder bestimmten Malignomen einhergehen, zeigen erhöhte Zahlen von Chromosomenaberrationen oder DSB-Akkumulationen in ihren Zellen (Ariyoshi K et al. 2007, Sehl ME et al. 2009, Sieber OM et al. 2003). Darüber hinaus weisen seltene pädiatrische Tumorprädispositionssyndrome wie die AT oder das NBS auf die essentielle Bedeutung der DSB-Reparatur in der Malignomentstehung hin (Kennedy RD & D'Andrea AD 2006). Da unreparierte DSB von allen DNA-Schäden die gravierendsten Folgen für die Zelle und den Organismus haben, sind im Rahmen der DSB-Reparatur auch viele Gene als Tumorsuppressorgene aktiv (D'Andrea AD & Grompe M 2003, Li D et al. 2009, Shiloh Y 2003). In der vorliegenden Pilotstudie sollten daher mögliche Zusammenhänge zwischen defizienter DSB-Reparatur und Tumorerkrankung im Kindesalter gefunden werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollgruppe in den gemittelten Focizahlen nach 5 und 8 h Reparaturzeit. Die Signifikanz blieb nach 8 h bei 2 Gy sogar bestehen, wenn man die vier Kinder mit den auffällig hohen Focizahlen (AITB, HNEE, LNEY und SSCL) bei der Auswertung nicht berücksichtigte. Darüber hinaus war die durchschnittliche spontane Rate an γ H2AX-Foci, ermittelt durch die Auswertung unbestrahlter Proben, bei den tumorkranken Kindern signifikant höher als bei den gesunden Kindern. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Malignome im Kindesalter womöglich generell auf einer genetischen Grundlage entstehen, durch die die DSB-Reparatur negativ beeinflusst wird.

Laut einer großen epidemiologischen Studie haben Überlebende kindlicher Tumoren zeitlebens ein persistierendes und hohes Risiko, ein Zweitmalignom zu entwickeln (Olsen JH et al. 2009). Dieses gesteigerte Risiko früherer pädiatrischer Krebspatienten ist wahrscheinlich eine Spätfolge der karzinogenen Eigenschaften der applizierten Radio- und Chemotherapie. Gleichzeitig kann bei diesen Patienten jedoch auch eine erhöhte genetische Prädisposition zur Malignomentwicklung vorliegen.

Es ist unbestritten, dass die DSB-Reparaturkapazität eine fundamentale Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität spielt. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie lassen vermuten, dass viele krebskranke Kinder eine leicht eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität haben könnten und so möglicherweise aus genetischen Gründen gefährdet sind, Malignome zu entwickeln. Weiterhin gibt es Kinder mit einer stärker eingeschränkten DSB-Reparaturfähigkeit, von denen in der Tumorgruppe vier identifiziert werden konnten. In zwei von vier Fällen der DSB-reparaturdefizienten Kinder der Tumorgruppe konnten Genmutationen identifiziert werden, die Regulationsfaktoren verschiedener DNA-Reparaturmechanismen betreffen und unterschiedliche, bereits bekannte Tumorprädispositionssyndrome verursachen. Bei dem Kind AITB war eine homozygote Mutation des PMS2-Gens festgestellt worden (Gottschling S et al. 2008). Biallele PMS2-Mutationen beeinträchtigen die MMR und verursachen auf diese Weise das Turcot-Syndrom (Tan TY et al. 2008, Sjursen W et al. 2009). Darüber hinaus haben experimentelle Studien gezeigt, dass die Reparatur von DSB in MMR-defizienten Zellen oft beeinträchtigt ist, was zu einer etwas erhöhten Radiosensitivität der Zellen führt (Elliott B & Jasin M 2001, Koh KH et al. 2005). Beschrieben wurden eine Beeinträchtigung der HR (Elliott B & Jasin M 2001), aber auch eine Störung des, für diese Studie interessanteren, NHEJ (Koh KH et al. 2005) in MMR-defizienten Zellen. Dies kann die etwas erhöhten Focizahlen und somit die leicht defiziente DSB-Reparatur des Kindes AITB mit der biallelen PMS2-Mutation erklären, wobei die suboptimale DSB-Reparatur vermutlich zusätzlich zur defizienten MMR zur genomischen Instabilität und Tumorigenese beiträgt.

Bei dem Kind LNEY konnte eine biallele Mutation im PALB2-Gen festgestellt werden (Reid S et al. 2007). PALB2-Mutationen verursachen, wie im genannten Artikel berichtet, einen neuen Subtyp der Fanconi-Anämie (FA-N) und prädisponieren zur Malignomentwicklung in der Kindheit. Weitere Forschungsarbeiten zeigen, dass das PALB2-Protein in nukleären Foci mit BRCA1, BRCA2 und teilweise mit γ H2AX nach ionisierender Bestrahlung kolokalisiert und demzufolge in der DNA-Schadensantwort mitzuwirken scheint (Bogliolo M et al. 2007,

Xia B et al. 2006 und 2007). BRCA2 unterstützt die DSB-Reparatur zwar hauptsächlich über die HR, BRCA1 jedoch wirkt in verschiedenen DNA-Reparaturwegen, auch beim NHEJ, mit (Durant ST & Nickoloff JA 2005, Xia F et al. 2001). BRCA1 und BRCA2 sind darüber hinaus in der Regulation der Zellantwort beteiligt, die auf Quervernetzungen der DNA durch bestimmte Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid, folgt (Xia B et al. 2007, Wang W 2007). Patienten mit Mutationen in diesen Genen oder dem Gen des BRCA2-Bindungspartners PALB2 können dementsprechend empfindlich auf Störungen der DNA-Integrität durch Chemo- oder Strahlentherapie reagieren. Bei der Patientin LNEY wurde nach der Diagnose des Subtyps FA-N der Fanconi-Anämie das Therapiekonzept entsprechend modifiziert. Neben einer intravenösen Chemotherapie nach dem HIT 2000-Protokoll erfolgte eine intrathekale Therapie mit Methotrexat. Diese wurde zunächst über einen Rickham-Katheter, dann jedoch aufgrund einer Schwellung um den Katheter lumbal gegeben. Anschließend erfolgte eine Strahlentherapie mit insgesamt 54 Gy in der Fossa posterior. Auf die simultane Bestrahlung der kraniospinalen Achse wurde wegen möglicher knochenmarkstoxischer Nebenwirkungen bei Fanconi-Anämie verzichtet. Fünf Monate nach Ende der Chemotherapie und drei Monate nach Ende der Strahlentherapie starb LNEY an einer Nekrose des Rückenmarks. Es liegt der Schluss nahe, dass die Patientin LNEY aufgrund ihres genetisch determinierten DSB-Reparaturdefektes die schwerwiegende Normalgewebs-toxizität einer letalen Rückenmarksnekrose erlitt. Im Allgemeinen werden neurologische Komplikationen, die mit systemischer oder intrathekaler Chemotherapie assoziiert sind, allerdings innerhalb von Stunden nach der Therapie manifest (Bay A et al. 2005, Watterson J et al. 1994). Es gibt jedoch auch einen Fallbericht, bei dem erst nach Monaten eine progressive ascendierende Paralyse auftrat (Dunton SF et al. 1986). In den meisten beschriebenen Fällen resultierte die Neurotoxizität aus der kumulativen Dosisintensität aller das ZNS betreffenden Therapien. Weiterhin kann die Reabsorption des Liquor cerebrospinalis durch eine kraniale Radiotherapie beeinträchtigt werden, was die toxischen Effekte von Chemotherapeutika erhöhen kann (Watterson J et al. 1994). Bei der Patientin LNEY könnten die kumulativen Effekte der vorausgehenden intrathekalen Methotrexatgaben und der systemischen Chemotherapie in Kombination mit dem genetisch determinierten DSB-Reparaturdefekt elf Monate nach Beginn der Therapie zu dieser fatalen Normalgewebs-toxizität geführt haben. Zudem postulierten Raney B et al. 1992, dass eine Bestrahlung der Fossa posterior mit 47 bis 55 Gy acht bis zehn Monate später zu einer Schwellung des Stammhirns oder zervikalen Rückenmarks führen kann, was wiederum den spinalen Liquorfluss einschränkt. Wenn auch die tatsächliche Ursache der letalen Rückenmarksnekrose

dieses Kindes nie durch eine pathologische Untersuchung geklärt werden konnte, da diese abgelehnt wurde, so wird man wenig andere Erklärungen als die oben beschriebenen finden. Ansonsten wurden bislang für vergleichbare Fälle lediglich spinale Metastasen, die bei LNEY radiologisch ausgeschlossen wurden, paraneoplastische Syndrome oder neurotrope Infektionen diskutiert (Ojeda VJ 1984).

Der ursächliche genetische oder epigenetische Defekt des Kindes HNEE mit dem mutmaßlichen Beckwith-Wiedemann-Syndrom konnte bislang nicht identifiziert werden, jedoch sind die Art und Zahl der multiplen frühkindlichen Malignome der stärkste Indikator für das Vorliegen dieses Tumorprädispositionssyndroms bei der Patientin (Alsultan A et al. 2008, Choufani S et al. 2010). Das Beckwith-Wiedemann-Syndrom beruht auf Methylierungsstörungen oder Mutationen einer der beiden Imprinting-Kontrollregionen des Chromosoms 11p15.5 oder entsteht durch paternale uniparentale Disomie (Enklaar T et al. 2006). Auch wenn bei HNEE keine Methylierungsstörungen im Bereich der Imprinting-Kontroll-Regionen von KCNQ10T1, H19 und IGF-2 gefunden wurden, lassen Forschungsarbeiten vermuten, dass HNEE durch epigenetische Fehlsteuerungen an einem Imprinting-Defekt erkrankt war (Bliok J et al. 2009, Choufani S et al. 2010).

Jüngste Studien berichten über eine klare Assoziation des Beckwith-Wiedemann-Syndroms mit assistierten Reproduktionsverfahren - wie der in-vitro-Fertilisation - verursacht durch ein gestörtes genomisches Imprinting (Lim D et al. 2009). HNEE wurde als Zwilling nach in-vitro-Fertilisation geboren. Je nach genetischer Ursache haben Kinder mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom insbesondere ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung embryonaler Tumoren (Choufani S et al. 2010, Tan TY& Amor DJ 2006). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Fehler bei der DNA-Methylierung und Histonmodifizierung, die den Aufbau des Chromatins betreffen, einen wichtigen Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität haben (Vidanes GM et al. 2005). So könnten, sofern bei dem Kind HNEE tatsächlich eine atypische oder noch nicht entdeckte DNA-Methylierungsstörung vorgelegen hat (Bliok J et al. 2009), die eindeutig erhöhten Focizahlen, beziehungsweise die eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität der Patientin, erklärt werden.

5.3 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung der γ H2AX-Foci

Die DSB-Reparaturfähigkeit der Kinder wurde in der vorliegenden Studie mittels der Methode der γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung von Lymphozyten durch das Verschwinden der γ H2AX-Foci über verschiedene Zeitpunkte quantifiziert.

Während den Untersuchungen zu dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass nach 0,5 h Reparaturzeit die Zählgenauigkeit der Foci bei denen mit 1 Gy bestrahlten Zellen höher war, als nach Bestrahlung mit 2 Gy, was an den hohen Focizahlen nach 2 Gy lag. Je höher die Focizahl, desto eher kommt es zur Überlagerung der Signale und damit zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Focizahl. In den folgenden Reparaturzeitpunkten ab 2,5 h gab es dieses Problem nicht mehr. Da zur Einschätzung der Reparaturfähigkeit der Kinder nur die späteren Reparaturzeitpunkte nach 5 oder 8 h zählten, machte sich dieser Umstand in der Bewertung der Ergebnisse nicht bemerkbar. Die geringe Strahlendosis von 1 oder 2 Gy wurde gewählt, um die Rate strahleninduzierter apoptotischer Prozesse in den Lymphozyten zu verringern, welche zu falsch hohen Focizahlen geführt hätten (Rogakou EP et al. 2000, Schnarr K et al. 2009).

Für die Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Lymphozytenkerne im verdünnten Vollblut röntgenbestrahlt. Im peripheren, venösen Blut befinden sich die meisten Lymphozyten in der G₀- oder der G₁-Phase des Zellzyklus (Sak A & Stuschke M 2010). Vereinzelt mitotische Lymphozyten können beim manuellen Zählen der γ H2AX-Foci am Fluoreszenzmikroskop leicht erkannt und eliminiert werden. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Abnahme der γ H2AX-Foci über die Zeit mit der Abnahme der DSB über die Zeit korreliert (Löbrich M et al. 2010, Rogakou EP et al. 1999, Rothkamm K & Löbrich M 2003, Sak A & Stuschke M 2010).

5.3.1 γ H2AX-Hintergrund-Fluoreszenz

Die durchschnittliche spontane Rate an γ H2AX-Foci, ermittelt durch die Auswertung unbestrahlter Proben, war bei den tumorkranken Kindern signifikant höher als bei den gesunden Kindern. Die Signifikanz blieb nach Abzug der vier auffälligen Kinder weiterhin bestehen. Damit hatte die Tumorgruppe im Schnitt eine höhere Hintergrund-Fluoreszenz im Sinne klarer γ H2AX-Foci als die Kontrollgruppe. In den meisten primären Säugerzellen treten γ H2AX-Foci ohne Trigger nur sehr selten auf, nur deshalb können DSB nach Bestrahlung im Milli-Gy-Bereich detektiert werden (Löbrich M et al. 2005, Olive PL 2009). In Zellen

hingegen, in denen gerade Meiose oder V(D)J-Rekombination stattfindet sowie in seneszenten oder apoptotischen Zellen, wobei in allen genannten Fällen DSB entstehen, werden endogene γ H2AX-Foci beobachtet (Olive PL 2009). Unterschiedliche γ H2AX-Hintergrund-Fluoreszenz-Intensitäten verschiedener unbestrahlter Tumorzelllinien wurden in einigen Veröffentlichungen diskutiert (Banáth JP & Olive PL 2003, Olive PL 2009, MacPhail SH et al. 2003, Mahrhofer H 2007, Yu T et al. 2006). Für die erhöhten Focizahlen wurden unter anderem ungeschützte Telomere in Tumorzellen, Zellzyklusinhibitionen, Chromatininstabilitäten und Chromosomenaberrationen verantwortlich gemacht (Nakamura AJ et al. 2008, Yu T et al 2006). In den genannten Veröffentlichungen wurden teilweise jedoch auch die Durchflusszytometrie und das Comet assay zur Quantifizierung der Foci verwendet. Unabhängig von der Methode der Auswertung scheint das Auftreten endogener γ H2AX-Foci von der genetischen Stabilität, der Zelllinie, der Dignität und dem Status im Zellzyklus abzuhängen (Löbrich M et al. 2010, Mahrhofer H 2007, Sak A & Stuschke M 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nicht unterschiedlich radiosensitive Zelllinien, Tumorzellen oder meiotische Zellen, sondern durchweg menschliche Lymphozyten aus peripherem Blut in der G₀- oder der G₁-Phase untersucht.

Eine Möglichkeit, den erhöhten Foci-Hintergrund in der Tumorgruppe zu erklären wäre, dass einige TuKi, aufgrund ihres genetischen Hintergrundes, die durch natürliche exogene oder endogene Vorgänge entstandenen DSB schlechter reparieren.

Um nicht die Hintergrund-Fluoreszenz im Sinne noch vorhandener DSB mitzumessen, sondern die reine Reparaturfähigkeit des Kindes über die Zeit, wurden die Werte der unbestrahlten Proben von den Werten der jeweils bestrahlten Proben abgezogen.

5.4 Wertigkeit der γ H2AX-Immunfluoreszenz als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung eine zuverlässige Methode darstellt, um DSB visualisieren und quantifizieren zu können. Dementsprechend folgten umfangreiche Messungen der Induktion und Reparatur von DSB mittels dieser Methode in verschiedenen Studien (u. a. Leatherbarrow EL et al. 2006, Löbrich M et al. 2005, Rogakou EP et al. 2000, Rothkamm K & Löbrich M 2003, Rube CE et al. 2008a und 2008b). Trotz der zahlreichen Vorteile der γ H2AX-Immunfluoreszenz-Methode als Marker für DSB muss sie jedoch, wie jede Methode, kritisch betrachtet werden.

Die Methode hat Grenzen, die in die Interpretation der Ergebnisse sorgfältig miteinbezogen werden müssen. Die Analyse von, nach Induktion von DSB entstandenen, phosphorylierten H2AX-Histonen deckt Reparaturdefizienzen im NHEJ auf, dem dominierenden DNA-Reparaturweg in Säugerzellen. Die Methode ist jedoch nicht geeignet, Reparaturdefizienzen in der von der Säugerzelle seltener verwendeten HR zu detektieren, die auf die S/G2-Phase im Zellzyklus beschränkt ist. Darüber hinaus berücksichtigt die γ H2AX-Methode, im Gegensatz zu physikalischen Methoden der DSB-Detektion wie der Pulsfeldgelelektrophorese (Iliakis G et al. 1991), nicht die aktuelle Rate an physikalischen DNA-DSB. Die γ H2AX-Methode registriert metabolische Aktivitäten der Zelle, die zur Unterstützung und Optimierung der DSB-Reparatur initiiert werden (Kinner A et al. 2008). Demzufolge gibt es Diskrepanzen zwischen der akuten Behebung von DSB, gemessen durch physikalische Änderungen von größenabhängigen Merkmalen von DNA-Molekülen, und der Messung der Abnahme von γ H2AX-Foci, die auf biochemischen Prozessen basiert. Bei der Pulsfeldgelelektrophorese können die DSB direkt nach der Bestrahlung nachgewiesen werden und es kommt zu einem wesentlich schnelleren Abfall der gemessenen DSB über die Zeit. Dies führt bei der Betrachtung kurzer Reparaturzeitpunkte wie 0,5 h zu extremen Unterschieden im Vergleich zu den Zahlen der indirekten γ H2AX -Methode, welche sich jedoch im Zeitverlauf nach mehreren Stunden ausgleichen. Diese Unterschiede der Messmethoden, die zu differierenden DSB-Reparaturkinetiken führen, wurden in verschiedenen Zellsystemen festgestellt und von Kinner A et al. (2008) ausführlich diskutiert. Die in dieser Arbeit zur Auswertung herangezogenen Reparaturzeitpunkte lagen bei 5 und 8 h und es kann somit von einer eindeutigen Korrelation der γ H2AX-Foci mit dem Auftreten von DSB ausgegangen werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist das verwendete Wort „Reparatur“ im Kontext der Experimente dieser Studie. Es bedeutet nicht, dass das entsprechende DNA-Molekül wieder in seinen ursprünglichen Zustand versetzt wird. Deletionen und Additionen von Basen rund um den DSB bleiben, genau wie ein nicht exaktes Zusammensetzen von DNA-Enden, von der γ H2AX-Methode unentdeckt. Dementsprechend kann die γ H2AX-Immunfluoreszenz-Methode nur wenige Informationen über die Genauigkeit des DSB-Reparaturprozesses liefern.

Zudem entstehen γ H2AX-Moleküle durch die Aktivierung von ATR im Bereich von Replikationsgabeln auch an DNA-Einzelstrangenden (Ward IM & Chen J 2001), sowie in alternden Zellen mit verkürzten Telomeren (d'Adda di Fagagna F et al. 2003) und bei induzierter zellulärer Seneszenz sogar ohne DNA-Schaden (Pospelova TV et al. 2009). Diese Probleme können bei der Verwendung peripherer Lymphozyten in der G₀/G₁-Phase des

Zellzyklus, wie in dieser Arbeit, weitgehend vermieden werden. ATM und die DNA-PK werden von DSB aktiviert, ATR wird von ausgeprägten Einzelstrangbrüchen aktiviert (Löbrich M et al. 2010). Die Bildung von γ H2AX-Foci in G₀/G₁-Zellen nach der Einwirkung ionisierender Strahlung ist ATM- oder DNA-PK-abhängig (Stiff T et al. 2004) und die Abnahme der Foci korreliert daher mit der Abnahme der DSB. Fazit ist: Die Anzahl der γ H2AX-Foci korreliert nur unter bestimmten Messbedingungen mit der Anzahl der DSB, ein γ H2AX-Fokus entspricht nicht unter allen Umständen einem DSB (Löbrich M et al. 2010).

Ein Vorteil der γ H2AX-Immunfluoreszenz gegenüber den physikalischen Methoden liegt in der Möglichkeit geringere, therapeutisch entsprechende, Strahlendosen unter 5 Gy verwenden zu können (Löbrich M et al. 2005, Rothkamm K & Löbrich M 2003, Sedelnikova OA et al. 2003). Somit stellt die γ H2AX-Methode ein exzellentes Modell für den klinischen Einsatz von ionisierender Strahlung dar. Der maßgebliche Vorteil der Quantifizierung von γ H2AX-Foci ist jedoch, dass unabhängig vom zugrundeliegenden molekularen Hintergrund die gesamte DNA einer Zelle auf ihre funktionelle Integrität hin überprüft werden kann. Dadurch können genetisch und epigenetisch verursachte Missstände in der Funktion der DSB-Reparatur, die die individuelle Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien bedingt, weitreichend überprüft werden (Sak A & Stuschke M 2010). Zudem kann die Methode für verschiedenste Zelltypen und Gewebe reproduzierbar angewandt werden (Rübe CE et al. 2008a).

5.5 Wertigkeit der γ H2AX-Immunfluoreszenz als prädiktiver Test für die klinische Radiosensitivität

Zur prätherapeutischen Messung der individuellen Strahlenempfindlichkeit eines Menschen mittels eines ex vivo-Tests wurden bereits einige Methoden vorgeschlagen: Borgmann K et al. (2002) und Leong T et al. (2004) versuchten das klonogene Überleben kultivierter Fibroblasten und Lymphozyten von Patienten nach ex vivo-Bestrahlung zu messen, die erzielten Ergebnisse korrelierten jedoch nicht gut mit der klinischen Beobachtung der Patienten. Alapetite C et al. (1999), Müller WU et al. (2001) und Oppitz U (1999) benutzten die Methode des Comet-Assay um in Lymphozyten DNA-Reparaturdefekte und Strahlenempfindlichkeit nachzuweisen, womit auch einige Ergebnisse mit gutem Vorhersagewert erzielt wurden. Löbrich M & Kiefer J (2006) merkten dazu jedoch an, dass das Comet-Assay im klinischen Alltag schwer durchzusetzen sei, da eine aufwendige Laborausstattung

vonnöten sei und die Methode sehr vom individuellen Untersucher abhängt. Barber JB et al. (2000), Borgmann K et al. (2002), Hoeller U et al. (2003) und Sprung CN et al. (2005) sind Arbeitsgruppen, die sich mit der Untersuchung von Chromosomenaberrationen und Mikrokernen in Lymphozyten beschäftigt haben; als prädiktive Tests haben diese Methoden jedoch bislang nicht überzeugen können. Als mittlerweile etablierte Methode, mit dem Potential zur Entwicklung eines prädiktiven Tests für die individuelle Strahlenempfindlichkeit, gilt die dieser Arbeit zugrundeliegende Methode der γ H2AX-Immunfluoreszenz (Banáth JP & Olive PL 2003, Löbrich M & Kiefer J 2006, Olive PL et al. 2004, Rogakou EP et al. 1999).

5.6 Weiterführende Studien – Ausblick

Die Patientenzahl dieser Pilotstudie ist klein, darum sind größer angelegte Studienformate vonnöten, um die Ergebnisse zu bestätigen und um definitivere Schlüsse ziehen zu können.

Im Verlauf der Untersuchungen für diese Studie wurde in unserer Arbeitsgruppe die hier angewandte Methode weiterentwickelt. So ist es auch möglich, die Lymphozyten vor der Bestrahlung zu separieren und in einem Nährmedium reparieren zu lassen (Rübe CE et al. 2010), um so eine stabilere Ausgangslage für eine längere Reparaturzeit der Zellen, wie etwa 24 Stunden, bei minimal benötigter Blutmenge, zu erhalten. Durch die Beobachtung längerer Reparaturzeiträume dürfte die Detektion reparaturdefizienter Kinder noch eindeutiger werden. Um die Studie in sehr großem Format weiterzuführen, müsste weiterhin die Möglichkeit der Kryokonservierung von Lymphozyten, Verschickung und der späteren Aufarbeitung geprüft werden. Vielleicht ließe sich durch die groß angelegte Prüfung der DSB-Reparaturfähigkeit von tumorkranken Kindern, gesunden Kindern und Kindern mit bekannten Syndromen auch Vergleiche zwischen unterschiedlichen pädiatrischen Tumorarten bezüglich ihrer Ätiologie oder Vergleiche zwischen bekannten genetischen Tumorprädispositionssyndromen anstellen.

Aufgrund der Daten dieser Studie kann vermutet werden, dass die γ H2AX-Immunfluoreszenz-Methode als prädiktiver Test im Routinescreening nicht nur pädiatrischer Krebspatienten dienen kann, um Menschen mit einem hohen Risiko für lebensbedrohliche Nebenwirkungen von Radio- oder Chemotherapie prätherapeutisch zu erfassen.

Mittels einer prätherapeutisch abgenommenen Blutprobe könnte innerhalb von etwa 24 Stunden die DSB-Reparaturkapazität eines Patienten mittels der γ H2AX-Methode bestimmt werden. Somit könnten, den Ergebnissen dieser Pilotstudie zufolge, Tumorpatienten mit einer

genetischen Prädisposition zur Entwicklung schwerwiegender Normalgewebstoxizitäten identifiziert und deren Therapieprotokolle entsprechend angepasst werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Ahlborn A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, Linet M, McBride M, Michaelis L, Olsen JH, Tynes T, Verkasalo PK. 2000.** A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer* **83**: 692-698.
2. **Aisenberg AC, Finkelstein DM, Doppke KP, Koerner FC, Boivin JF, Willett CG. 1997.** High risk of breast carcinoma after irradiation of young women with hodgkin's disease. *Cancer* **79**: 1203-1210.
3. **Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E. 1999.** Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* **83**: 83-90.
4. **Alsultan A, Lovell MA, Hayes KL, Allshouse MJ, Garrington TP. 2008.** Simultaneous occurrence of right adrenocortical tumor and left adrenal neuroblastoma in an infant with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Blood Cancer* **51**: 695-698.
5. **Ariyoshi K, Suzuki K, Goto M, Watanabe M, Kodama S. 2007.** Increased chromosome instability and accumulation of DNA double-strand breaks in Werner syndrome cells. *J Radiat Res (Tokyo)* **48**: 219-231.
6. **Armstrong GT, Liu Q, Yasui Y, Neglia JP, Leisenring W, Robison LL, Mertens AC. 2009.** Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* **14**: 2328-2338.
7. **Auerbach AD. 2003.** Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 8, Unit 8.7.
8. **Auerbach AD. 2009.** Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* **668**: 4-10.
9. **Bagby GC, Alter BP. 2006.** Fanconi anemia. *Semin Hematol* **43**: 147-156.
10. **Banáth JP, Olive PL. 2003.** Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **63**: 4347-4350.
11. **Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D. 2000.** Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* **55**: 179-186.
12. **Barfield RC, Kasow KA, Hale GA. 2008.** Advances in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Biol Ther* **7**: 1533-1539.
13. **Bartsch H, Dally H, Popanda O, Risch A, Schmezer P. 2007.** Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response. *Cancer Res* **174**: 19-36.

14. **Baumann M, Hölscher T, Begg AC. 2003.** Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project. *Radiother Oncol* **69**: 121-125.
15. **Bay A, Oner AF, Etlik O, Yilmaz C, Caksen H. 2005.** Myelopathy due to intrathecal chemotherapy: Report of six cases. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**: 270-272.
16. **Beckwith JB. 1963.** Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele, hyperplasia of the kidneys and pancreas and Leydig cell hyperplasia – another syndrome? *Presented at annual meeting of Western Society for Pediatric Research, Los Angeles, California.*
17. **Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J. 2006.** Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* **173**: 195-206.
18. **Bentzen SM. 1993.** Quantitative clinical radiobiology. *Acta Oncol* **32**: 259-275.
19. **Bentzen SM. 2006.** Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* **6**: 702-713.
20. **Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, Meadows AT. 1996.** Breast cancer and other second neoplasms after childhood hodgkin's disease. *N Engl J Med* **334**: 745-751.
21. **Birch JM. 1999.** Genes and cancer. *Arch Dis Child* **80**:1-3.
22. **Bisogno G, Scotti G, Nowicki Y, Ferrari A, Garaventa A, Zanetti I, Favre C, Schiavetti A, Tamaro P, Carli M. 2004.** Soft tissue sarcoma as a second malignant neoplasm in the pediatric age group. *Cancer* **100**: 1758-1765.
23. **Bithell JF, Stewart AM. 1975.** Pre-natal irradiation and childhood malignancy: a review of British data from the Oxford Survey. *Br J Cancer* **31**: 271-287.
24. **Blik J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, Mannens MM. 2001.** Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* **10**: 467-476.
25. **Blik J, Verde G, Callaway J, Maas SM, De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Russo S, Ferraiuolo S, Rinaldi MM, Fischetto R, Lalatta F, Giordano L, Ferrari P, Cubellis MV, Larizza L, Temple IK, Mannens MM, Mackay DJ, Riccio A. 2009.** Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* **17**: 611-619.
26. **Boder E, Sedgwick RP. 1958.** A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* **21**: 526-554.
27. **Bölling T, Schuck A, Rube C, Hesselmann S, Pape H, Dieckmann K, Pöllinger B, Kortmann RD, Speiser-Held I, Meyer FM, Martini C, Asadpour B,**

- Timmermann B, Beck JD, Langer T, Paulides M, Schmidt B, Willich N. 2006.** Behandlungsassoziierte Spätfolgen nach Strahlentherapie maligner Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Machbarkeitsanalyse einer prospektiven multizentrischen Registerstudie. *Strahlenther Onkol* **182**: 443-449.
28. **Bölling T, Schuck A, Pape H, Rube C, Meyer FM, Martini C, Timmermann B, Asadpour B, Kortmann RD, Beck JD, Langer T, Paulides M, Könemann S, Willich N, gemeinsam mit der „Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Radioonkologie“ (APRO). 2007a.** Register zur Erfassung von Spätfolgen nach Strahlentherapie im Kindes- und Jugendalter – erste Ergebnisse. *Klin Pädiatr* **219**: 139-145.
29. **Bölling T, Schuck A, Pape H, Rube C, Meyer FM, Martini C, Timmermann B, Asadpour B, Kortmann RD, Beck JD, Langer T, Paulides M, Willich N. 2007b.** German register for detection of late sequelae after radiotherapy for children and adolescents (RiSK): Present status and first results. *Strahlenther Onkol* **183 Spec No 2**: 7-8.
30. **Bogliolo M, Lyakhovich A, Callén E, Castellà M, Cappelli E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Kalb R, Neveling K, Schindler D, Surrallés J. 2007.** Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J* **26**: 1340-1351.
31. **Borgmann K, Roper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dork T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Dapi J. 2002.** Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* **64**: 141-152.
32. **Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, Petersen C, Szymczak S, Ziegler A, Feyer P, Alberti W, Dikomey E. 2008.** Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**: 256-264.
33. **Brannan CI, Bartolomei MS. 1999.** Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 164-170.
34. **Buka I, Koranteng S, Osornio Vargas AR. 2007.** Trends in childhood cancer incidence: review of environmental linkages. *Pediatr Clin North Am* **54**: 177-203.
35. **Burden DA, Kingma PS, Froelich-Ammon SJ, Bjornsti MA, Patchan MW, Thompson RB, Osheroff N. 1996.** Topoisomerase II etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J Biol Chem* **271**: 29238-29244.
36. **Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen D. 2001.** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 42462-42465.
37. **Calaminus G, Weinspach S, Teske C, Göbel U. 2007.** Quality of survival in children and adolescents after treatment for childhood cancer: the influence of reported late effects on health related quality of life. *Klin Pädiatr* **219**: 152-157.

38. **Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. 2003.** Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**: 675-679.
39. **Chen P, Liang J, Wang Z, Zhou X, Chen L, Li M, Xie D, Hu Z, Shen H, Wang H. 2008.** Association of common PALB2 polymorphisms with breast cancer risk: A case-control study. *Clin Cancer Res* **14**: 5931-5937.
40. **Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. 2008.** Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica* **47**: 809-824.
41. **Chodick G, Ronckers CM, Shalev V, Ron E. 2007.** Excess lifetime cancer mortality risk attributable to radiation exposure from computed tomography examinations in children. *Isr Med Assoc J* **9**: 584-587.
42. **Choufani S, Shuman C, Weksberg R. 2010.** Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part C* **154C**: 343-354.
43. **Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. 2003.** Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34.
44. **Chun HH, Gatti RA. 2004.** Ataxia-teleangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair* **3**: 1187-1196.
45. **Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. 2002.** Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* **62**: 3347-3350.
46. **Cohen MM Jr. 2005.** Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* **8**: 287-304.
47. **Cooper LJ. 2009.** New approaches to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric cancers. *Curr Oncol Rep* **11**: 423-430.
48. **Croul S, Otte J, Khalili K. 2003.** Brain tumors and polyomaviruses. *J Neurovirol* **9**: 173-182.
49. **d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003.** A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**: 194-198.
50. **D'Andrea AD, Grompe M. 2003.** The fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* **3**: 23-34.
51. **De la Torre C, Pincheira J, López-Sáez JF. 2003.** Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. *Histol Histopathol* **18**: 225-243.

52. **De Vos M, Hayward B, Bonthron DT, Sheridan E. 2005.** Phenotype associated with recessively inherited mutations in DNA mismatch repair (MMR) genes. *Biochem Soc Trans* **33**: 718-720.
53. **Dickerman JD. 2007.** The late effects of childhood cancer therapy. *Pediatrics* **119**: 554-568.
54. **Digweed M, Sperling K. 2004.** Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst.)* **3**: 1207-1217.
55. **Dronkert ML, Kanaar R. 2001.** Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* **486**: 217-247.
56. **Dunton SF, Nitschke R, Spruce WE, Bodensteiner J, Krous HF. 1986.** Progressive ascending paralysis following administration of intrathecal and intravenous cytosine arabinoside. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* **57**:1083-1088.
57. **Durant ST, Nickoloff JA. 2005.** Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell cycle* **4**: 1216-1222.
58. **Eiser C. 1998.** Practitioner review: Long-term consequences of childhood cancer. *J Child Psychol Psychiat* **39**: 621-633.
59. **Elliott B, Jasin M. 2001.** Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21**: 2671-2682.
60. **Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D. 2006.** Beckwith-Wiedemann syndrom: Multiple molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Med* **8**: 1-19.
61. **Fanconi G. 1927.** Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrb Kinderh* **117**: 257–280.
62. **Felix CA. 2001.** Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors. *Med Pediatr Oncol* **36**: 525-535.
63. **Ferguson DO, Alt FW. 2001.** DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* **20**: 5572-5579.
64. **Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. 2002.** DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* **4**: 993-997.
65. **Fernet M, Hall J. 2004.** Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1237-1243.
66. **Fonatsch C. 2010.** The role of chromosome 21 in hematology and oncology. *Genes Chromosomes Cancer* **49**: 497-508.

67. **Foster ER, Downs JA. 2005.** Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J* **272**: 3231-3240.
68. **Garber JE, Offit K. 2005.** Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol* **23**: 276-292.
69. **Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NGJ, Lange K, Lathrop GM, Leppert M, Nakamura Y, O'Connell P, Paterson M, Salser W, Sanal O, Silver J, Sparkes RS, Susi E, Weeks DE, Wei S, White R, Yoda F. 1988.** Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* **336**: 577-580.
70. **Gillet JP, Gottesmann MM. 2010.** Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol* **596**: 47-76.
71. **Gleeson HK, Shalet SM. 2001.** Endocrine complications of neoplastic diseases in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr* **13**: 346-351.
72. **Gottschling S, Reinhard H, Pagenstecher C, Krüger S, Raedle J, Plotz G, Henn W, Buettner R, Meyer S, Graf N. 2008.** Hypothesis: Possible role of retinoic acid therapy in patients with biallelic mismatch repair gene defects. *Eur J Pediatr* **167**: 225-229
73. **Greaves M. 2002.** Childhood leukaemia. *BMJ* **324**: 283-287.
74. **Gulbis B, Eleftheriou A, Angastiniotis M, Ball S, Surrallés J, Castella M, Heimpel H, Hill A, Corrons JL. 2010.** Epidemiology of rare anaemias in europe. *Adv Exp Med Biol* **686**: 375-396.
75. **Hall EJ. 2000.** *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
76. **Hall EJ. 2006.** Intensity-modulated radiation therapy, protons, and the risk of second cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**: 1-7
77. **Halperin EC, Constine LS, Tarbell NJ, Kun LE. 1999.** Late effects of cancer treatment. In: Halperin EC, Constine LS, Tarbell NJ, Kun LE (eds). *Pediatric radiation oncology*, Raven Press, New York. **3rd ed**: 538-562.
78. **Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, Burger PC, Wood PA, Taqi F, Booker SV, Petersen GM, Offerhaus GJA, Tersmette AC, Giardiello FM, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995.** The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* **332**: 839-847.
79. **Hammer GP, Seidenbusch MC, Schneider K, Regulla DF, Zeeb H, Spix C Blettner M. 2009.** A cohort study of childhood cancer incidence after postnatal diagnostic X-ray exposure. *Radiat Res* **171**: 504-512.
80. **Henderson TO, Whitton J, Stovall M, Mertens AC, Mitby P, Friedman D, Strong LC, Hammond S, Neglia JP, Meadows AT, Robison L, Diller L. 2007.** Secondary

- sarcomas in childhood cancer survivors: A report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* **99**: 300-308.
81. **Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. 2007.** DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst.)* **6**: 923-935.
 82. **Hewitt M, Weiner SL, Simone JV (eds). 2003.** *Childhood cancer survivorship: Improving care and quality of life*. The National Academies Press, Washington D.C.
 83. **Hoeijmakers JH. 2001.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374.
 84. **Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeiy A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E. 2003.** Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* **69**: 137-144.
 85. **Hortobágyi GN. 1997.** Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* **54**: 1-7.
 86. **Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK. 2011.** SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.
 87. **Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y, Hobbie W, Chen H, Gurney JG, Yeazel M, Recklitis CJ, Marina N, Robison LR, Oeffinger KC. 2003.** Health status of adult long-term survivors of childhood cancer. A report from the childhood cancer survivor study. *JAMA* **290**: 1583-1592.
 88. **Iliakis GE, Cicilioni O, Metzger L. 1991.** Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of ¹²⁵I decay. *Int J Radiat Biol* **59**: 343-357
 89. **Jackson SP. 2001.** Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem Soc Trans* **29**: 655-661.
 90. **Jackson SP. 2002.** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**: 687-696.
 91. **Jeggo PA. 1998.** DNA breakage and repair. *Adv Genet* **38**: 185-218.
 92. **Jeggo P. 2010.** The role of the DNA damage response mechanisms after low-dose radiation exposure and a consideration of potentially sensitive individuals. *Radiat Res* **174**: 825-832.
 93. **Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. 2002.** Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**: 153-164.

94. **Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T. 2001.** Quantification of late complications after radiation therapy. *Radiother Oncol* **61**: 233-246.
95. **Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Crocetti E, Magnani C, Spix C, Zambon P. 2006a.** Time trends of cancer incidence in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* **42**: 1961-1971.
96. **Kaatsch P, Spix C, Schüz C. 2006b.** Epidemiologie, Ätiologie, Prävention. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C (eds). *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, Springer Medizin Verlag 2006, Heidelberg, pp 421-435.
97. **Kaatsch P, Spix C, Schulze-Rath R, Schmiedel S, Blettner M. 2008.** Leukaemia in young children living in the vicinity of German nuclear power plants. *Int J Cancer* **122**: 721-726.
98. **Kaatsch P, Scheidemann-Wesp U, Schüz J. 2010.** Maternal use of antibiotics and cancer in the offspring: results of a case-control study in Germany. *Cancer Causes Control* **21**: 1335-1345.
99. **Kaatsch P. 2010.** Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev* **36**: 277-285.
100. **Kabacik S, Mackay A, Tamber N, Manning G, Finnon P, Paillier F, Bouffler S, Badie C. 2011.** Gene expression following ionising radiation: Identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int J Radiat Biol* **87**: 115-129.
101. **Kennedy RD, D'Andrea AD. 2006.** DNA repair pathways in clinical practice: Lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol* **24**: 3799-3808.
102. **Khanna KK, Jackson SP. 2001.** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**: 247-254.
103. **Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. 2008.** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* **36**: 5678-5694.
104. **Kinzler KW, Vogelstein B. 1997.** Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**: 761-763.
105. **Klein G, Michaelis J, Spix C, Wibbing R, Eggers G, Ritter J, Kaatsch P. 2003.** Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer* **39**: 808-817.
106. **Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Burma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. 2009.** Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun* **20**: 752-757.

107. **Koh KH, Kang HJ, Li LS, Kim NG, You KT, Yang E, Kim H, Kim HJ, Yun CO, Kim KS, Kim H. 2005.** Impaired nonhomologous endjoining in mismatch repair-deficient colon carcinomas. *Lab Invest* **85**: 1130-1138.
108. **Kony SJ, De Vathaire F, Chompret A, Shamsaldim A, Grimaud E, Raquin MA, Oberlin O, Brugières L, Feunteun J, Eschwège F, Chavaudra J, Lemerle J, Bonaiti-Pellié C. 1997.** Radiation and genetic factors in the risk of secondant malignant neoplasms after a first cancer in childhood. *Lancet* **350**: 91-95.
109. **Krüger L, Demuth I, Neitzel H, Varon R, Sperling K, Chrzanowska KH, Seemanova E, Digweed M. 2007.** Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* **28**: 107-111.
110. **Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. 2011.** Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* **711**: 193-201.
111. **Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, Hanenberg H, Auerbach AD. 2003.** A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* **101**: 1249-1256.
112. **Lam WW, Hatada I, Ohishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TR, Donnai D, Reik W, Schofield PN, Maher ER. 1999.** Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* **36**: 518-523.
113. **Langer T, Stöhr W, Bielack S, Paulussen M, Treuner J, Beck JD. 2004.** Late effects surveillance system for sarcoma patients. *Pediatr Blood Cancer* **42**: 373-379.
114. **Leatherbarrow EL, Harper JV, Cucinotta FA, O'Neill P. 2006.** Induction and quantification of γ -H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int J Radiat Biol* **82**: 111-118.
115. **Le Deley MC, Leblanc T, Shamsaldin A, Raquin MA, Lacour B, Sommelet D, Chompret A, Cayuela JM, Bayle C, Bernheim A, de Vathaire F, Vassal G, Hill C. 2003.** Risk of secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: a case-control study by the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol* **21**: 1074-1081.
116. **Leong T, Borg M, McKay M. 2004.** Clinical and cellular radiosensitivity in inherited human syndromes. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **16**: 206-209.
117. **Leskovac A, Vujic D, Guc-Scekic M, Petrovic S, Joksic I, Slijepcevic P, Joksic G. 2010.** Fanconi anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks. *Tohoku J Exp Med* **221**: 69-76.
118. **Li D, Suzuki H, Liu B, Morris J, Liu J, Okazaki T, Li Y, Chang P, Abbruzzese JL. 2009.** DNA repair gene polymorphisms and risk of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 740-746.
119. **Lieber MR. 2008.** The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* **283**: 1-5.

120. **Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, Lam W, Oley C, Cole T, Brueton LA, Reik W, MacDonald F, Maher ER. 2009.** Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* **24**: 741-747.
121. **Linnet MS, Wacholder S, Zahm SH. 2003.** Interpreting Epidemiologic Research: Lessons From Studies of Childhood Cancer. *Pediatrics* **112**: 218-232.
122. **Little MP. 2009.** Cancer and non-cancer effects in Japanese atomic bomb survivors. *J Radiol Prot* **29**: 43-59.
123. **Löbrich M, Kühne M, Wetzel J, Rothkamm K. 2000.** Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes Cancer* **27**: 59-68.
124. **Löbrich M, Jeggo PA. 2005.** Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA repair* **4**: 749-759.
125. **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. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8984-8989.
126. **Löbrich M, Kiefer J. 2006.** Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy. *Int J Cancer* **118**: 2652-2656.
127. **Löbrich M, Jeggo PA. 2007.** The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* **7**: 861-869.
128. **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**: 662-669.
129. **Lusis EA, Travers S, Jost SC, Perry A. 2010.** Glioblastomas with giant cell and sarcomatous features in patients with turcot syndrome type 1: a clinicopathological study of 3 cases. *Neurosurgery* **67**: 811-817.
130. **MacPhail SH, Banáth JP, Yu Y, Chu E, Olive PL. 2003.** Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiat Res* **159**: 759-767
131. **Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. 2009.** Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by nonhomologous end-joining. *Biochem J* **417**: 639-650.
132. **Mahrhofer H. 2007.** *Strahleninduzierte DNA-Schäden und deren Reparatur in humanen Tumor- und Fibroblastenzelllinien detektiert mittels Histon γ H2AX.*, Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg.
133. **Matsuura S, Tauchi H, Nakamura A, Kondo N, Sakamoto S, Endo S, Smeets D, Solder B, Belohradsky BH, Der Kaloustian VM, Oshimura M, Isomura M, Nakamura Y, Komatsu K. 1998.** Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* **19**: 179-181.

134. **McKinney PA. 2005.** Central nervous system tumours in children: Epidemiology and risk factors. *Bioelectromagnetics* **7**: 60-68.
135. **McNally RJ, Cairns DP, Eden OB, Alexander FE, Taylor GM, Kelsey AM, Birch JM. 2002.** An infectious aetiology for childhood brain tumours? Evidence from space-time clustering and seasonality analyses. *Br J Cancer* **86**: 1070-1077.
136. **Meinert R, Schüz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. 2000.** Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* **151**: 639-46.
137. **Merzenich H, Schmiedel S, Bennack S, Brüggemeyer H, Philipp J, Blettner M, Schüz J. 2008.** Childhood Leukemia in Relation to Radio Frequency Electromagnetic Fields in the Vicinity of TV and Radio Broadcast Transmitters. *Am J Epidemiol* **168**: 1169-1178
138. **Millen FJ, Rainey MG, Hows JM, Burton PA, Irvine GH, Swirsky D. 1997.** Oral squamous cell carcinoma after allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anaemia. *Br J Haematol* **99**: 410-414.
139. **Müller WU, Bauch T, Stüben G, Sack H, Streffer C. 2001.** Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. *Radiat Environ Biophys* **40**: 83-89.
140. **Nakamura AJ, Chiang YJ, Hathcock KS, Horikawa I, Sedelnikova OA, Hodes RJ, Bonner WM. 2008.** Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* **1**: 6.
141. **Neglia JP, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, Donaldson SS, Meadows AT, Robison LL. 2001.** Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer. Childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* **93**: 618-629.
142. **Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, Yasui Y, Kasper CE, Mertens AC, Donaldson SS, Meadows AT, Inskip PD. 2006.** New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* **98**: 1528-1537.
143. **Noordzji JG, Verkaik NS, van der Burg M, van Veelen LR, de Bruin-Versteeg S, Wiegant W, Vossen JM, Weemaes CM, de Groot R, Zdzienicka MZ, van Gent DC, van Dongen JJ. 2003.** Radiosensitive SCID patients with Artemis gene mutations show a complete B-cell differentiation arrest at the pre-B-cell receptor checkpoint in bone marrow. *Blood* **101**: 1446-1452.
144. **Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL. 2006.** Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* **355**: 1572-1582.
145. **Ojeda VJ. 1984.** Necrotizing myelopathy associated with malignancy. A clinicopathologic study of two cases and literature review. *Cancer* **53**: 1115-1123.

146. **Olive PL, Banáth JP, Sinnott LT. 2004.** Phosphorylated histone H2AX in spheroids, tumors, and tissues of mice exposed to etoposide and 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,3-dioxide. *Cancer Res* **64**: 5363-5369.
147. **Olive PL. 2009.** Endogenous DNA breaks: gammaH2AX and the role of telomeres. *Aging (Albany NY)* **17**: 154-156.
148. **Olsen JH, Garwicz S, Hertz H, Jonmundsson G, Langmark F, Lanning M, Lie SO, Moe PJ, Moller T, Sankila R, Tulinius H. 1993.** Second malignant neoplasms after cancer in childhood or adolescence. Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology Association of the Nordic cancer Registries. *BMJ* **307**: 1030-1036.
149. **Olsen JH, Möller T, Anderson H, Langmark F, Sankila R, Tryggvadóttir L, Winther JF, Rechnitzer C, Jonmundsson G, Christensen J, Garwicz S. 2009.** Lifelong cancer incidence in 47.697 patients treated for childhood cancer in the Nordic countries. *J Natl Cancer Inst* **101**: 806-813.
150. **Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. 1999.** Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. *Strahlenther Onkol* **175**: 341-346.
151. **Paraf F, Jothy S, Van Meir EG. 1997.** Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* **15**: 2744-2758.
152. **Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J. 2003.** DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res* **31**: 6819-6827.
153. **Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000.** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* **10**: 886-895.
154. **Pfeifer K. 2000.** Mechanisms of genomic imprinting. *Am J Hum Genet* **67**: 777-787.
155. **Pinto FO, Leblanc T, Chamoussat D, Le Roux G, Brethon B, Cassinat B, Larghero J, de Villartay JP, Stoppa-Lyonnet D, Baruchel A, Socié G, Gluckman E, Soulier J. 2009.** Diagnosis of Fanconi anemia in patients with bone marrow failure. *Haematologica* **94**: 487-495.
156. **Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EL, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. 2009.** Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* **8**: 4112-4118.
157. **Preston DL, Cullings H, Suyama A, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K, Kasagi F, Shore RE. 2008.** Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed in utero or as young children. *J Natl Cancer Inst* **100**: 428-436.
158. **Pritchard-Jones K, Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Stiller CA, Coebergh JWW. 2006.** Cancer in children and adolescents in Europe: Developments over 20 years and future challenges. *Eur J Cancer* **42**: 2183-2190.

159. **Raaschou-Nielsen O, Andersen CE, Andersen HP, Gravesen P, Lind M, Schüz J, Ulbak K. 2008.** Domestic radon and childhood cancer in Denmark. *Epidemiology* **19**: 536-543.
160. **Rahman N, Ashworth A. 2004.** A new gene on the X involved in Fanconi anemia. *Nat Genet* **36**: 1142-1143.
161. **Raney B, Tefft M, Heyn R, Newton W, Jones PM, Haerberlen V, Maurer H. 1992.** Ascending myelitis after intensive chemotherapy and radiation therapy in children with cranial parameningeal sarcoma. *Cancer* **69**: 1498-1506.
162. **Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. 2002.** Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* **12**: 162-169.
163. **Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, Neveling K, Kelly P, Seal S, Freund M, Wurm M, Batish SD, Lach FP, Yetgin S, Neitzel H, Ariffin H, Tischkowitz M, Mathew CG, Auerbach AD, Rahman N. 2007.** Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet* **39**: 162-164.
164. **Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G. 2004.** Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:6635-6640.
165. **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.
166. **Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999.** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-916.
167. **Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. 2000.** Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of γ H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**: 9390-9395.
168. **Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. 1999.** The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* **17**: 56-72.
169. **Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. 2008.** Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* **93**: 511-517.
170. **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 U S A* **100**: 5057-5062.
171. **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.

172. **Rübe CE, Dong X, Kühne M, Fricke A, Kaestner L, Lipp P, Rübe C. 2008a.** DNA double-strand break rejoining in complex normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **72**: 1180-1187.
173. **Rübe CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rübe 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**: 6546-6555.
174. **Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rübe C. 2010.** Repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**: 359-369.
175. **Rush JS, Fugmann SD, Schatz DG. 2004.** Staggered AID-dependent DNA double strand breaks are the predominant DNA lesions targeted to S mu in Ig class switch recombination. *Int Immunol* **16**: 549-557.
176. **Sadetzki S, Chetrit A, Lubina A, Stovall M, Novikov I. 2006.** Risk of thyroid cancer after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Clin Endocrinol Metab* **91**: 4798-4804.
177. **Sadetzki S, Mandelzweig L. 2009.** Childhood exposure to external ionising radiation and solid cancer risk. *Br J Cancer* **100**: 1021-1025.
178. **Sak A, Stuschke M. 2010.** Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* **20**: 223-231
179. **Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Hareyama M. 2007.** Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity. *Radiat Med* **25**: 433-438.
180. **Salum FG, Martins GB, de Figueiredo MA, Cherubini K, Yurgel LS, Torres-Pereira C. 2006.** Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi anemia. *Braz Dent J* **17**: 161-165.
181. **Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. 1995.** A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**: 1749-1753.
182. **Schmidt LS, Kamper-Jorgensen M, Schmiegelow K, Johansen C, Lähteenmäki P, Träger C, Stokland T, Grell K, Gustafson G, Kogner P, Sehested A, Schüz J. 2010.** Infectious exposure in the first years of life and risk of central nervous system tumours in children: analysis of birth order, childcare attendance and seasonality of birth. *Br J Cancer* **102**:1670-1675.

183. **Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. 2009.** Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **74**: 1424-1430.
184. **Schüz J, Kaatsch P. 2002.** Epidemiology of pediatric tumors of the central nervous system. *Expert Rev Neurother* **2**: 469-479.
185. **Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. 2002.** Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* **158**: 486-492.
186. **Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM. 2003.** Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther.* **2**: 233-235.
187. **Sehl ME, Langer LR, Papp JC, Kwan L, Seldon JL, Arellano G, Reiss J, Reed EF, Dandekar S, Korin Y, Sinsheimer JS, Zhang ZF, Ganz PA. 2009.** Associations between single nucleotide polymorphisms in double-stranded DNA repair pathway genes and familial breast cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 2192-2203.
188. **Shiloh Y. 2003.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155-168.
189. **Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. 2008.** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18**: 134-147.
190. **Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IP. 2003.** Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* **3**: 701-708.
191. **Signorello LB, Cohen SS, Bosetti C, Stovall M, Kasper CE, Weathers RE, Whitton JA, Green DM, Donaldson SS, Mertens AC, Robison LL, Boice JD Jr. 2006.** Female survivors of childhood cancer: Preterm birth and low birth weight among their children. *J Natl Cancer Inst* **98**: 1453-1461.
192. **Sigurdson AJ, Ronckers CM, Mertens AC, Stovall M, Smith SA, Liu Y, Berkow RL, Hammond S, Neglia JP, Meadows AT, Sklar CA, Robison LL, Inskip PD. 2005.** Primary thyroid cancer after a first tumour in childhood (the Childhood Cancer Survivor Study): a nested case-control study. *Lancet* **365**: 2014-2023.
193. **Sjursen W, Bjørnevoll I, Engebretsen LF, Fjelland K, Halvorsen T, Myrvold HE. 2009.** A homozygote splice site PMS2 mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer* **8**: 179-186.
194. **Sklar CA. 2001.** Endocrine complications of the successful treatment of neoplastic diseases in childhood. *Growth Genet Horm* **17**: 37-42.
195. **Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. 2008.** Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer* **122**: 1859-1867.
196. **Sprung CN, Chao M, Leong T, McKay MJ. 2005.** Chromosomal radiosensitivity in two cell lineages derived from clinically radiosensitive cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**: 6352-6358.

197. **Staszewski O, Nikolova T, Kaina B. 2008.** Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen* **49**: 734-740.
198. **Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. 2005a.** International Classification of Childhood Cancer, Third Edition. *Cancer* **103**: 1457-1467.
199. **Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW. 2005b.** Trends in childhood cancer incidence in Europe, 1970–1999. *Lancet* **365**: 2088.
200. **Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. 1999.** The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **99**: 577-587.
201. **Stiff T, O’Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. 2004.** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**: 2390-2396.
202. **Stiller CA. 2004.** Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23**: 6429-6444.
203. **Sugiyama T, Kowalczykowski SC. 2002.** Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem* **277**: 31663-31672
204. **Svensson JP, Stalpers LJ, Esveldt-van Lange RE, Franken NA, Haveman J, Klein B, Turesson I, Vrieling H, Giphart-Gassler M. 2006.** Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med* **3**: e422.
205. **Taalman RD, Jaspers NG, Scheres JM, de Wit J, Hustinx TW. 1983.** Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. *Mutat Res* **112**: 23-32.
206. **Takeshita M, Grollman AP, Ohtsubo E, Ohtsubo H. 1978.** Interaction of bleomycin with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5983-5987.
207. **Tan TY, Amor DJ. 2006.** Tumour surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: a critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice. *J Paediatr Child Health* **42**: 486-490.
208. **Tan TY, Orme LM, Lynch E, Croxford MA, Dow C, Dewan PA, Lipton L. 2008.** Biallelic PMS2 mutations and a distinctive childhood cancer syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* **30**: 254-257.
209. **Taylor AM, Harndem DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA. 1975.** Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* **258**: 427-429.

210. **Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF. 2005.** Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* **97**: 813-822.
211. **Tischkowitz MD, Hodgson SV. 2003.** Fanconi anaemia. *J Med Genet* **40**: 1-10.
212. **Tischkowitz M, Xia B. 2010.** PALB2/FANCN: recombining Cancer and Fanconi Anemia. *Cancer Res* **70**: 7353-7359.
213. **Tucker MA, Jones PH, Boice JD Jr, Robison LL, Stone BJ, Stovall M, Jenkin RDT, Lubin JH, Baum ES, Siegel SE, Meadows AT, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. 1991.** Therapeutic radiation at a young age is linked to secondary thyroid cancer. *Cancer Res* **51**: 2885-2888.
214. **Turcot J, Després JP, St. Pierre F. 1959.** Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* **2**: 465-468.
215. **Vidanes GM, Bonilla CY, Toczyski DP. 2005.** Complicated tails: Histone modifications and the DNA damage response. *Cell* **121**: 973-976.
216. **Vilchez RA, Butel JS. 2003.** SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* **22**: 5164-5172.
217. **Vogelstein B, Kinzler KW. 2004.** Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-799.
218. **Wakeford R, Kendall GM, Little MP. 2009.** The proportion of childhood leukaemia incidence in Great Britain that may be caused by natural background ionizing radiation. *Leukemia* **23**: 770-776.
219. **Wang W. 2007.** Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet* **8**: 735-748.
220. **Ward IM, Chen J. 2001.** Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**: 47759-47762.
221. **Watterson J, Toogood I, Nieder M, Morse M, Friedich S, Lee Y, Moertel CL, Priest JR. 1994.** Excessive spinal cord toxicity from intensive central nervous system-directed therapies. *Cancer* **74**: 3034-3041.
222. **Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. 2003.** Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**: R61-68.
223. **Weng EY, Moeschler JB, Graham JM Jr. 1995.** Longitudinal observations on 15 children with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* **56**: 366-373.
224. **Weterings E, van Gent DC. 2004.** The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst.)* **3**: 1425-1435.

225. **Wiedemann HR. 1964.** Familial malformation complex with umbilical hernia and macroglossia – a “new syndrome”? *J Genet Hum* **13**: 223-232.
226. **Wiedemann HR. 1983.** Tumours and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Eur J Pediatr* **141**: 129.
227. **Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Bérubé A, Yang Q, Liu S, Krewski D. 2008.** Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **11**: 373-517.
228. **Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN. 2004.** Repair of radiation damage to DNA. *Br J Cancer* **90**: 1297-1301.
229. **Xia B, Sheng Q, Nakanashi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. 2006.** Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* **22**: 719-729.
230. **Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, Pals G, Errami A, Gluckman E, Llera J, Wang W, Livingston DM, Joenie H, de Winter JP. 2007.** Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* **39**: 159-161.
231. **Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, Zeng ZC, Willers H, Iliakis G, Powell SN. 2001.** Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8644-8649.
232. **Yang YG, Saidi A, Frappart PO, Min W, Barrucand C, Dumon-Jones V, Michelon J, Herczeg Z, Wang ZQ. 2006.** Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J* **25**: 5527-5538.
233. **Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, Klovov D, Olive PL. 2006.** Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair* **5**: 935-946.
234. **Zeltzer LK, Recklitis C, Buchbinder D, Zebrack B, Casillas J, Tsao JC, Lu Q, Krull K. 2009.** Psychological status in childhood cancer survivors: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* **27**: 2396-2404.
235. **Zou J, Tao Z, Sun Q, Akiba S, Zha Y, Sugahara T, Wei L. 2005.** Cancer and non-cancer epidemiological study in the high background radiation area of Yangjiang, China. *International Congress Series* **1276**: 97-101.

Web:

Deutsches Kinderkrebsregister. Jahresberichte 2006/2007, 2008 und 2009. –Stand: 09.08.11- URL: <http://www.kinderkrebsregister.de>

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011 –Stand 16.08.11- URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/

Universitätsklinikum Münster, Strahlentherapie. Dokumentationsbögen der RiSK-Studie. Studienleitung: Prof. Dr. med. N. Willich. –Stand: 09.08.11- URL: http://www.klinikum.uni-muenster.de/index.php?id=stth_foschung_risk

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Bundesamt für Strahlenschutz . 2011. Umweltradioaktivität und Strahlenbelastung: Jahresbericht 2009. –Stand: 09.08.11- URL: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0221-201103025410>

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Rübe CE, Fricke A, Schneider R, Simon K, Kühne M, Fleckenstein J, Gräber S, Graf N, Rübe C. 2010. Repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **78**: 359-369

Danksagung

Ich danke allen, die mir während des Projektes zur Seite gestanden haben:

Prof. Dr. med. Claudia E. Rube

Prof. Dr. med. Christian Rube

Dr. rer. nat. Martin Kühne

Dr. rer. nat. Andreas Fricke

Daniela Ludwig

den Krankenschwestern und Pflegern der Ambulanz der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik des Saarlandes

Prof. Dr. med. Norbert Graf

den Ärztinnen, Ärzten und Kinderkrankenschwestern der hämatologisch-onkologischen Ambulanz und Station der Universitätskinderklinik des Saarlandes

Dr. med. Karin Simon

Meiner Familie und meinen Freunden

Christian

Lebenslauf

Name: Ruth Schneider

Geburtsdatum: 05.02.1984

Geburtsort: Trier

Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1990 – 1990 Grundschule Max-Halbe-Straße, Düsseldorf

1990 – 1994 Grundschule Viktoria, Püttlingen

1994 – 2003 Marienschule, Saarbrücken

06/2003 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes

9/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2008 – 2009 Praktisches Jahr im Klinikum Saarbrücken

11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/2009 Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang:

seit 02/2010 Assistenzärztin an der Universitätskinderklinik Tübingen